

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON
IN-VITRO EIGENSCHAFTEN EINIGER TGE
(ÜBERTRAGBARE GASTROENTERITIS)
VIRUSSTÄMME

Günter Heß

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr
Angefertigt unter Leitung von: PD Dr. P. A. Bachmann

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON IN-VITRO EIGENSCHAFTEN
EINIGER TGE (ÜBERTRAGBARE GASTROENTERITIS) VIRUSSTÄMME

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von Günter Heß
aus Wahlbach

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München



Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: PD Dr. P.A. Bachmann
Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 21.2.1975

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1 Definition von Markern	2
2.2 Bedeutung von Markern bei Viren	2
2.3 Biologische Marker	3
2.3.1 Virulenz	4
2.3.2 Adsorption an Zellen bzw. Organe	9
2.3.3 Vermehrungskinetik	12
2.3.4 Verhalten in Zellkulturen	13
2.3.4.1 Vermehrung in verschiedenen Zellkulturen	14
2.3.4.2 Plaquebildung	17
2.3.5 Antigenetische Unterschiede	21
2.3.5.1 Neutralisationskinetik	21
2.3.5.2 Immunogenität	25
2.3.6 Interferonproduktion und -sensibilität	27
2.4 Physikalische und chemische Marker	30
2.4.1 Temperatur, Formalin, UV-Bestrahlung, pH-Wert Änderung	30
2.4.2 Sedimentation in Dichtegradienten	34
2.4.3 Verhalten gegenüber Polyanionen	35
2.4.4 Wirkung von Farbstoffen	38
2.4.4.1 Photoinaktivierung	39
2.4.4.2 Resistenz gegenüber photoinaktivierenden Farbstoffen	40
2.4.5 Inaktivierung durch Dithiothreitol	40
2.4.6 Inaktivierung durch Guanidinhydrochlorid	41

	Seite
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	42
3.1 Material und Methoden	42
3.1.1 Virusmaterial	42
3.1.2 Zellkulturen	42
3.1.2.1 Herstellung von Schweine- schilddrüsen-(ST)zellkulturen	42
3.1.2.2 Zell-Linien	44
3.1.3 Medien	44
3.1.4 Virustitrierung	45
3.1.5 Vermehrungsfähigkeit bei verschie- denen Temperaturen	45
3.1.6 Vermehrungskurve bei 37° C	46
3.1.7 Plaquebildung	46
3.1.7.1 Plaquebildung unter Agaroverlay	46
3.1.7.2 Plaquebildung unter Tyloseo- overlay	47
3.1.8 Immunserumherstellung	48
3.1.9 Plaque-Neutralisationskinetik	48
3.1.10 Inaktivierung durch Dithiothreitol	49
3.2 Ergebnisse	50
3.2.1 Vermehrungsfähigkeit bei ver- schiedenen Temperaturen	50
3.2.2 Vermehrungskurve bei 37° C	52
3.2.3 Vermehrung in Schweine-Zell-Linien	54
3.2.4 Plaquebildung unter Agaroverlay	54
3.2.5 Neutralisationskinetik	58
3.2.6 Inaktivierung durch Dithiothreitol	61
3.3 Besprechung der Ergebnisse	62
3.4 Zusammenfassung	66
4. LITERATURVERZEICHNIS	68

1. EINLEITUNG

Die Übertragbare Gastroenteritis (TGE) der Schweine ist eine hochkontagiöse, lokale Darmerkrankung, von der Tiere aller Altersgruppen befallen werden können. Bei Ferkeln im Alter bis zu 14 Tagen kann die Mortalität bis zu 100% betragen, bei atypischem Verlauf der Infektion sind Verluste auch bei Mastläufern von bis zu 30% beobachtet worden.

Entsprechend groß ist die wirtschaftliche Bedeutung der Seuche. Moderne Formen der Schweinehaltung, die eine arbeitsteilige Produktion beinhalten, lassen die TGE besonders im Zuchtbetrieb zum unlösbaren Problem werden.

Ein Schutz vor der Infektion ist bisher nur möglich, wenn trächtige Sauen eine natürliche Infektion mit virulentem Virus überstanden haben und in der Folge über das Kolostrum und die Milch genügend IgA-Antikörper gegen TGE auf die Ferkel übertragen.

Alle Versuche, eine IgA-Stimulierung mit Hilfe von inaktiviertem oder attenuiertem Virus bei Sauen zu provozieren, die ausreicht, um die Ferkel über Milch und Kolostrum vor TGE-Infektionen zu schützen, waren bislang erfolglos.

Es ist nicht bekannt, auf welchen biologischen Eigenschaften die unterschiedliche IgA-Stimulierung von virulentem Feldvirus und attenuiertem Zellkulturvirus in-vivo beruht. Systematische in-vitro Untersuchungen fehlen.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es daher, bei 4 TGE Virusstämmen (1 Feldisolat, 1 zellkulturadaptiertes Virus und 2 über Serienpassagen in Zellkulturen geführte Stämme) in-vitro verschiedene biologische Eigenschaften zu untersuchen und eventuelle Unterschiede festzustellen.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Definition von Markern

Als Marker werden biologische oder chemisch-physikalische Merkmale serologisch gleicher oder ähnlicher Virusstämme bezeichnet, die genetisch festgelegt sind. Sie zeigen sich in unterschiedlichem Verhalten zweier oder mehrerer Stämme eines Serotyps in Bezug auf eine bestimmte Eigenschaft bei konstant gleichbleibenden Versuchsbedingungen (v. STRENGE, 1972).

2.2 Bedeutung von Markern bei Viren

Markeruntersuchungen haben sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Impfstoffherstellung und -prüfung, aber auch zur Kontrolle von Reihenimpfungen mit Lebendvaccinen in tierischen und menschlichen Populationen Bedeutung erlangt. Für die Grundlagenforschung sind Marker wichtig, da sie eine Aussage über die unterschiedliche intraserotypische Hetero- oder Homogenität einzelner Virusgruppen gestatten. Da alle Marker genetisch verankert sind, kann man anhand von Mutationen oder Rekombinanten die Orte auf der Nukleinsäure bestimmen, an die diese Eigenschaften fixiert sind. So sind z.B. von Poliomyelitisviren (BENGTTSSON, 1968) oder Influenzaviren (KILBOURNE, 1967) Genkarten aufgestellt worden, auf denen die Lage einzelner Marker zueinander linear dargestellt ist. Sie sind ein erster Schritt zur Aufklärung der Nukleinsäurestruktur der betreffenden Viren.

Eine mindestens ebenso große Bedeutung haben Marker für die Impfstoffherstellung und -prüfung. Ein attenuierter Impfstamm, der sich durch eine oder mehrere Eigenschaften von anderen Stämmen des gleichen Serotyps unterscheidet,

läßt sich wesentlich leichter in Bezug auf Verunreinigung mit anderen Stämmen oder seine genetische Stabilität kontrollieren.

Wird der Impfstamm dann als Lebendimpfstoff in einer Population eingesetzt, in der "wilde" Feldstämme vorkommen, kann man ihn anhand seiner stabilen Marker sicher differenzieren und identifizieren (KOPROWSKI et al., 1960).

Deshalb wird heute von sehr vielen Ländern zuerst eine sichere Methode zur Identifizierung des Impfstammes gefordert, bevor ein Lebendimpfstoff eingesetzt werden darf, wie z.B. beim Einsatz des Rhinopneumonitis Lebendimpfstoffes in Schweden (KLINGEBORN, 1973). Hier stellen einfach durchzuführende Markerteste die Methode der Wahl dar.

2.3 Biologische Marker

Als biologische Marker werden solche Eigenschaften und Merkmale serologisch gleicher Virusstämme bezeichnet, die sich in-vitro oder in-vivo auf biologischen Systemen reproduzieren lassen, also z.B. im bebrüteten Ei, im Versuchstier oder auf der Zellkultur. Es handelt sich um folgende Eigenschaften:

- a Virulenz
- b Adsorption an Zellen bzw. Organe
- c Vermehrungskinetik
- d Verhalten in Zellkulturen
 - 1. Vermehrung in verschiedenen Zellkulturen
 - 2. Plaquebildung
- e antigenetische Unterschiede
 - 1. serologische Kinetik
 - 2. Immunogenität
- f Interferoninduktion bzw. -empfindlichkeit

2.3.1 Virulenz

Unter der Virulenz eines Virusstammes versteht man den Grad seiner krankmachenden Eigenschaften in einem bestimmten Wirt unter genau definierten Bedingungen, die Impfdosis, Applikationsart usw. betreffen.

Fast alle Eigenschaften eines Virusstammes, die bei Markeruntersuchungen getestet werden, stehen in direktem oder indirektem Zusammenhang mit der Virulenz des betreffenden Stammes. Die Virulenz ist damit die wichtigste Eigenschaft einer Erregerart. Demzufolge zielen alle Versuche zur Gewinnung einer Lebendvaccine darauf hin, durch geeignete Verfahren die Virulenz eines Stammes zu schwächen oder schwach virulente Stämme eines Erregers zu selektieren. Dabei müssen die immunogenen Eigenschaften erhalten bleiben.

Es gibt einige Virusarten, die gewöhnlich schon nach einer geringen Anzahl von Passagen in Zellkulturen ihre Virulenz größtenteils verloren haben. Dazu gehören z.B. einige der früher als "Arboviren" bezeichneten Arten, während die Viren der Herpesgruppe ihre Virulenz für den Wirtsorganismus auch nach zahlreichen Zellkulturpassagen nur schwer verlieren.

DUNAYEVICH et al. (1961) isolierten den Western Equine Encephalitis (WEE) Virusstamm B 628 von einem Sperling. Das Isolat wurde auf Hühnerembryozellkulturen geklont. Von verschiedenen Klonen wurden 10er-Verdünnungen auf Babymäuse und 3 Wochen alte Mäuse intracerebral verimpft. Der am schwächsten virulente Klon für 3 Wochen alte Mäuse wurde erneut plaque-gereinigt und auf Virulenz für Mäuse geprüft. Auf diese Weise wurden 5 Passagen durchgeführt. Nach der 4. Passage wurde ein Klon isoliert, der bei 3 Wochen alten Mäusen nicht mehr pathogen war. Die Tiere waren immun gegenüber einer intracerebralen Testinfektion mit einem be-

kannten WEE-Stamm. Der Klon der 5. Passage wurde anschließend fünfmal in Babymausgehirnen passiert. Nach der 4. Babymauspassage hatte der Klon seine krankmachende Eigenschaft für 3 Wochen alte Mäuse teilweise wiedererlangt.

BANERJEE u. SINGH (1969) hatten Chikungunya-Virus sechzehnmal auf einer Aedes albopictus Zell-Linie passiert, wobei das Virus seine Virulenz für Babymäuse so weit verlor, daß 5 Tage p. inf. keine Maus gestorben war. Nach Infektion mit dem Elternvirusstamm dagegen waren alle Babymäuse nach 2 1/2 Tagen gestorben. Die gleichzeitig untersuchten Virusarten West Nile, Japanese Encephalitis und Sindbis änderten ihre Virulenz für Babymäuse nicht.

Ein klassisches Beispiel für unterschiedliche Virulenz innerhalb einer Virusart stellen die lento-, meso- und velogenen Stämme des Newcastle Disease Virus (NDV) dar.

HANSON (1956) entwickelte eine Testmethode, um lentogene von mesogenen Stämmen zu unterscheiden. Dazu wurden 10 Eintagsküken intracerebral mit einer genau festgelegten Impfdosis infiziert. Es folgte ein Beobachtungszeitraum von 8 Tagen, in denen Krankheitserscheinungen und Todesfälle täglich aufgezeichnet wurden. Mit Hilfe einer Formel, in der Todesfälle gegenüber Krankheitserscheinungen doppelt gewertet wurden, errechnete HANSON den "neuropathischen Index" (NI) des untersuchten Stammes. Stämme mit einem NI von 0,0 bis 0,25 wurden als lentogen bezeichnet, solche zwischen 0,5 und 1,8 als mesogen. Die Menge des intracerebral gegebenen Testvirus beeinflusste den NI nur unwesentlich, wenn die Dosis über 10 KükenLD₅₀ lag.

Der Test ist sehr sensibel. Er zeigt Verunreinigungen auch noch an, wenn der verunreinigende Stamm in einer Konzentration von 1:10000 vorliegt.

Mesogene Stämme dürfen wegen ihrer noch vorhandenen Virulenz für Küken bis zu 8 Wochen nicht als Lebendimpfstoff eingesetzt werden. Lentogene Stämme, z.B. Hitchener B 1, werden heute erfolgreich zur oralen Vaccinierung eingesetzt.

NIETZSCHKE u. SCHMITTDIEL (1960) propagierten einen modifizierten Hanson-Test zur Bestimmung der Virulenz von NDV-Stämmen. Durch Infizierung von Eintagsküken (intracerebral und i.m.), Hühnerembryonen und Mäusen (intracerebral) konnten sie 16 "wilde" von 4 Impfstämmen durch sogenannte "Bewertungszahlen der Pathogenität" unterscheiden.

Virulente, von paralytisch erkrankten Patienten isolierte Poliovirusstämme besitzen in der Regel den d^+ (Wachstum unter Agar mit niedrigem Bikarbonatgehalt) und den $RCT-40^+$ Marker (Vermehrung bei $40^{\circ}C$). Im Gegensatz dazu sind die Stämme der hoch attenuierten Lebendvaccine d^- und $RCT-40^-$. BENYISH-MELNICK und MELNICK (1960) untersuchten über 100 Stämme, die von vaccinierten Kindern isoliert worden waren. Eine beträchtliche Anzahl der Isolate zeigte nach in-vivo Passage eine Reversion der Marker nach d^+ und $RCT-40^+$. Diese Instabilität der in-vitro Marker zeigte sich auch in der veränderten Neurovirulenz für Affen. Während intracerebral inokulierte Vaccinestämme (10^7 KID₅₀) für Affen avirulent waren, verursachten d^+ und $RCT-40^+$ Stämme eine Paralyse. Dagegen benötigte man nach intraspinaler Inokulation 10^4 KID₅₀ der Vaccinestämme, um 50% der Affen zu töten, während dazu nur 10 KID₅₀ der d^+ und $RCT-40^+$ -Isolate benötigt wurden. Letztere waren daneben auch für Schimpansen virulent, im Gegensatz zu den Vaccinestämmen. Stämme, die eine Reversion ihres d und $RCT-40$ Charakters gezeigt hatten, behielten ihre neue Eigenschaft auch nach 4maliger Passage in Affen bei. Die Ergebnisse zeigten, daß der $RCT-40$ Charakter nicht ausreichte, um hochattenuierte Stämme zu identifizieren, und daß ein attenuierter Stamm sei-

nen RCT-40 Charakter behalten konnte, dabei aber trotzdem einen Anstieg seiner Neurovirulenz für Affen zeigte. PENSART et al. (1970 a) verglichen die Virulenz des zellkultur-adaptierten Transmissible-Gastroenteritis (TGE) Virus SH-Stammes mit dem virulenten Purdue Stamm bei 4 bis 6 Tage alten Ferkeln. Der SH Stamm war in 37 Passagen primärer Schweinenierenzellkulturen adaptiert worden und wurde mit Infektiositätstitern von 10^4 bis 10^5 KID₅₀/ml zur Infektion der Ferkel eingesetzt. Dabei stellten sie bei dem SH-Stamm eine verlängerte Inkubationszeit von 36 bis 60 Stunden fest, gegenüber 24 Stunden bei dem virulenten Stamm. Nur die Hälfte der Ferkel zeigten nach Infizierung mit dem SH-Stamm Erbrechen. Die pathologischen Veränderungen des Dünndarms unterschieden sich kaum von denen des virulenten Stammes außer, daß sie verzögert und in einem kleineren Teil des Dünndarms in Erscheinung traten. 19 von 33 (57%) infizierten Ferkeln starben nach der Infektion mit dem adaptierten SH-Stamm, während die Mortalität bei dem virulenten Stamm 100% betrug. Daneben wurde der zellkulturadaptierte Stamm 4mal in Ferkeln passiert und titriert. Dabei liefen niedrige Verdünnungen der Virus-suspensionen in den Ferkeln wieder eine kürzere Inkubationszeit von 24 Stunden hervor, während die Inkubationszeit der höheren Verdünnungen bis zu 3 Tage betrug. Die Infektiosität für Ferkel stieg in diesen 4 Passagen von 10^3 auf 10^6 ID₅₀/ml, während die Infektiosität für Schweinenierenzellkulturen von $10^{5,2}$ auf $10^{2,5}$ KID₅₀/ml sank. Der adaptierte Stamm gewann also seine Virulenz für Ferkel teilweise zurück.

WITTE und EASTERDAY (1968) beobachteten eine ähnliche Abnahme der Virulenz bei dem TGE-Purdue Stamm. Ein Stamm, der 43 Schweinenierenpassagen durchlaufen hatte, wirkte in einer Infektionsdosis von 10^5 KID₅₀ bei 8 infizierten Ferkeln nicht mehr letal. Die mittlere Krankheitsdauer war

bei diesen Ferkeln signifikant gegenüber dem wilden Stamm reduziert.

SHEFFY (1965) konnte bei 2 Wochen alten Ferkeln mit der 45. Passage des SH-Stammes weder nach i.m. noch nach oraler Infizierung eine Krankheit auslösen. Ähnliche Ergebnisse wurden von japanischen Autoren (OKINAWA et al. 1965) berichtet, die nach Infektion neugeborener Ferkel mit der 82. Zellkulturpassage des SH-Stammes keine Zottenatrophie des Dünndarms mehr beobachten konnten.

Eine Abnahme der Virulenz wurde nach Zellkulturpassagen auch bei anderen Virusarten beobachtet.

MAYR und WITTMANN (1960) passierten das Virus der Maul- und Klauenseuche 450mal in Nierenzellkulturen von Kalb, Schwein und Maus. Nach der 300. Kälbernierenpassage kam es noch zur Bildung kleiner Primärbläschen auf der Zunge 8-16 Monate alter Rinder bei Infizierung des Zungenepithels. Diese Reaktion blieb nach der 370. Passage aus. Der hoch attenuierte Virusstamm hatte jedoch seine immunogenen Eigenschaften erhalten und führte zur Ausbildung einer belastbaren Immunität.

Die 300. Schweinenierenzellkulturpassage führte dagegen sowohl zur Abnahme der Virulenz als auch zum Verlust der immunogenen Eigenschaften für das Schwein.

MAYR et al. (1961) prüften die Abnahme der Virulenz des Virus der ansteckenden Schweinelähmung (Teschener Erkrankung).

Nach der 90. Schweinenierenzellkulturpassage konnten sie bei 6-8 Wochen alten Ferkeln weder nach oraler noch nach intracerebraler Infizierung ($10^{8,3}$ KID₅₀/ml) eine Krankheit hervorrufen.

SELLERS (1963) verglich die Virulenz eines MKS-Feldvirusstammes mit einem kükenadaptierten Stamm, der keine oder abortive Zungenepithelläsionen bei Rindern hervorrief. Der Titer des Feldvirus war auf bovinen Zungenepithel-

kulturen halb so hoch wie in Babymäusen, wogegen der attenuierte Stamm auf den Epithelkulturen 50fach niedrigere Titer erreichte als in Babymäusen.

VON BÜLOW (1966) berichtete über die Attenuierung von Infektiöse-Bronchitis (IB)-Virusstämmen. Die Virulenz von IBV Stämmen für Küken sank schon nach 5-10 Passagen in Hühnerembryonierenzellkulturen wesentlich stärker als nach 20-120 Eipassagen. Dagegen stieg die Virulenz für Hühnerembryonen nach Serienpassagen in Eiern an, im Gegensatz zu Serienpassagen in Zellkulturen. Der Autor charakterisierte die Virulenz der einzelnen Stämme durch den sog. Reaktionswert, einen Index für die Summe der nach der Infektion beobachteten klinischen Symptome. Es bestand eine deutliche Korrelation zwischen der Länge der Inkubationszeit und dem Grad der Virulenz, jedoch keine Korrelation mit der von den geimpften Küken entwickelten Immunität gegen das homologe Virus.

2.3.2 Adsorption an Zellen bzw. Organe

Zur Selektion eines attenuierten Virusstammes adsorbierte CAMPBELL (1969) einen MKS-Virusstamm Typ A der 120. Passage in primären Kälbernierenzellkulturen an Mäusenierenzellen. Er homogenisierte die Nieren von erwachsenen Mäusen und ließ eine bestimmte Anzahl Viruseinheiten 5 Stunden lang an jeweils gleiche Mengen Nierenzellhomogenisat adsorbieren.

Nach Zentrifugation des Gemisches wurde der Überstand auf nicht adsorbiertes Virus titriert. Dieses nicht adsorbierbare Virus wurde in 10 aufeinanderfolgenden Passagen immer wieder mit Zellhomogenisat behandelt. Nach 5 Stunden waren 0,3 - 0,8% der Elternviruspopulation nicht adsorbiert. In der nächsten Adsorptionspassage war dieser Anteil auf 17% gestiegen. Diese Relation bestand auch noch nach der

10. Passage. Das auf diese Weise selektierte Virus war weniger virulent für erwachsene Mäuse als das Elternvirus. Es war für Mäuse immunogen und dem Elternvirus antigenetisch ähnlich.

Den Zusammenhang von reduzierter Adsorptionsrate und Virulenzverlust bestätigen Untersuchungen von anderen Autoren (EGGERS und SABIN, 1959; KUNIN, 1962) an Polio-, ECHO- und Coxsackieviren. So prüfte KUNIN (1962) die Adsorptionsfähigkeit von Gehirnhomogenisaten verschieden alter Mäuse für Coxsackie B1 Virus. Der Autor ging davon aus, daß in-vivo nur Babymäuse für das Virus empfänglich sind. In diesen Versuchen nahm die Adsorptionsfähigkeit der Gehirnhomogenisate mit steigendem Alter der Mäuse ab. Virulente Stämme wurde von Homogenisaten 1-2 Tage alter Mäuse stärker adsorbiert als von älteren Mäusen.

ALBRECHT und SCHUMACHER (1972) adsorbierten 6 Masernvirusstämme im Zusammenhang mit verschiedenen physikalischen Eigenschaften an Gehirnhomogenisate von Mensch, Affe und Hamster. Hier zeigte nur ein an Hamstergehirne adaptierter Stamm eine erhöhte Bindungsfähigkeit an alle 3 Gehirnsuspensionen. Dagegen unterschieden sich zwei attenuierte Stämme, ein virulenter Stamm und zwei SSPE-Isolate in dieser Hinsicht nicht.

HAFEZ und LIESS (1972) untersuchten die Adsorptionskinetik von 4 Bowine-Virusdiarrhoe (BVD)-Stämmen mit primären Kälberhodenzellkulturen, indem sie die Monolayer jeweils mit 100 PFU/ml infizierten und nach bestimmten Zeitintervallen je zur Hälfte homologe Antiseren bzw. Erhaltungsmedium zfügten. In den mit Antiseren behandelten Zellkulturen blieb die Plaquezahl bis 60 Minuten p.inf. deutlich hinter derjenigen der unbehandelten Kulturen zurück. Danach war kein Unterschied mehr feststellbar, d.h. nach 60 Minuten war die Adsorptionsphase der 4 Stämme abgeschlossen, ohne daß in dieser Hinsicht stammspezifische Unterschiede festgestellt werden konnten.

SCHIFF et al. (1973) führten die Adsorptionskinetik von Enteroviren und von BVD Virus sowohl getrennt als auch in einer Doppelinfektion an suspendierten fetalen bovinen Nieren- und Milzzellen durch. Auffallend war dabei die sehr hohe Adsorptionsfähigkeit von fetalen Milzzellen, die nach 1 Stunde schon 96% des BVD Virus gebunden hatten (nach 2 Std.: 98%), während in der Doppelinfektion - zuerst bis zur Sättigung Enterovirus gebunden, danach BVD Virusadsorption - nach 1 Std. nur 50% des BVD Virus adsorbiert waren.

Eine primäre Enterovirusinfektion hemmte also in diesem in-vitro System die Adsorption des BVD Virus. Inwieweit allerdings derartige Ergebnisse auf in-vivo Verhältnisse übertragen werden können, bleibt fraglich.

DANIEL und MELENDEZ (1968) untersuchten neben anderen biologischen Eigenschaften die Adsorptionsrate von 2 Herpes-T-Virus-Varianten in Kaninchennierenzellmonolayern. Sie prüften eine Variante (LPV), die große Plaques bildete und eine Variante (SPV), die kleine Plaques bildete. Nach 15 Minuten waren 60% der LPV, aber erst 31% der SPV von der Zellkultur adsorbiert worden. Nach 1 Stunde betrug das Verhältnis 73% und 55%. Diese Werte wurden mit 2 verschiedenen Techniken erzielt.

1.) Das nicht adsorbierte Virus wurde nach verschiedenen Intervallen (15-120Min.) mit PBS abgewaschen und die Monolayer mit Agar überschichtet.

2.) Der nicht adsorbierte Überstand der Monolayer wurde nach 1, 2, 3 und 4 Stunden auf neue Zellkulturen verimpft, nochmals eine Stunde adsorbiert und nach 5 Tagen abgelesen. Beide Methoden zeigten, daß SPV wesentlich langsamer adsorbiert wird als LPV.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen überein, die PATTYN und VLESSCHAUWER (1966) mit Plaque-Varianten von Middleburg-Toga-Virus erzielten. Sie stehen aber im Gegensatz zu

CHOPPIN und EGGERS (1962), die mit SPV Varianten eines Cocksackie-B4-Stammes eine schnellere Adsorption an Affennierenzellkulturen erreichten als mit LPV Varianten.

2.3.3 Vermehrungskinetik

DE MAEYER und ENDERS (1964/65) untersuchten die Vermehrungskinetik eines in 33 humanen Amnionzellkulturen (HA) passierten Masernstammes, sowie eines Stammes der 14. Hühnerembryozellkulturpassage (CE), der vom ersten Stamm isoliert wurde. Bei einer "input multiplicity" beider Stämme von 1:1000 in primären humanen Amnionzellkulturen wurde bei beiden Stämmen gleichzeitig am 2. Tag p.inf. freies Virus gebildet, jedoch mit einem Infektiositätstiterunterschied von 10^1 . Dieser Unterschied vergrößerte sich bis zum 19. Tag p.inf. bei dem HA Stamm auf das 100fache des CE-Stammes. Im Gegensatz dazu induzierte der CE-Stamm einen 4fach höheren Interferontiter in dieser Zellkultur.

Das gleiche Experiment wurde auf Hela-Zellen wiederholt. Auch in dieser Zell-Linie produzierte der HA Stamm signifikant höhere Infektions- und niedrigere Interferontiter als der CE Stamm.

CHOPPIN und EGGERS (1962) prüften die Vermehrungskinetik zweier Varianten des Cocksackie B4-Powers-Stammes. Bei einer "input multiplicity" von 26 KID₅₀/Zelle für die a^S Variante und 19 KID₅₀/Zelle für die a^I Variante betrug die Latenzzeit 3,5 Stunden für beide Stämme. Der a^S Stamm entwickelte signifikant höhere Infektiositätstiter in Affennierenzellen (nach 6 Std. $10^{7,2}$ PFU/ml, nach 12 Std. $10^{7,4}$ PFU/ml) als der a^I Stamm (nach 6 Std. $10^{5,1}$ PFU/ml, nach 12 Std. $10^{6,0}$ PFU/ml). Auch die Virusfreisetzung aus der Zelle vollzog sich schneller und in größerem Ausmaß als bei dem a^I Stamm. Beide Stämme unterschieden sich weiterhin noch durch folgende Eigenschaften:

Tab. 1: Biologische Eigenschaften von a^S und a^I
Coxsackie B 4 Virusvarianten (nach CHOPPIN
und EGGERS, 1962)

a^S Variante	a^I Variante
empfindlich für Agar-Inhibitor	nicht empfindlich
kleine Plaques	große Plaques
große Plaques mit DEAE-Dextran	unbeeinflusst durch DEAE-Dextr.
schnelle Adsorption	langsame Adsorption
schnelle Vermehrung	langsame Vermehrung
schnelle Freisetzung	verzögerte Freisetzung
hohe Infektiosität / Zelle	niedrige Infektiosität / Zelle
hohe Antikörperaffinität	geringe Antikörperaffinität

Diese Marker erwiesen sich über 9 Passagen in Affennierenzellkulturen als stabil.

BANERJEE und SINGH (1969) untersuchten die Vermehrungskinetik von 3 Chikungunya-Virusstämmen. Ein Mäusegehirn-adaptierter Stamm erreichte in Verozellkulturen höchste Infektiositätstiter nach 48 Std. bzw. 60 Std. mit 10^7 bzw. 10^6 KID₅₀/ml. Ein in 16 Aedes albopictus-Zellkulturpassagen adaptierter Stamm produzierte gleichbleibende Infektiositätstiter von $10^{3,5}$ KID₅₀/ml zwischen der 24. und 96. Std. p.inf. . Die Titer der 30. Passage des Stammes waren zu keiner Zeit größer als $10^{1,0}$ KID₅₀/ml. Die Infektiosität in Vero-Zellkulturen korrelierte mit der Neurovirulenz in Mäusen.

2.3.4 Verhalten in Zellkulturen

Nachdem die Zellkulturtechnik längst die Methode der Wahl zur Reproduktion fast aller Viren geworden ist, ist die Erforschung des zellulären Wirtsspektrums anhand von cyto-

pathischem Effekt (CPE) und Plaquebildung von Virusgruppen und -stämmen wohl die am häufigsten verwendete Untersuchungsmethode bei der Suche nach in-vitro Markern.

2.3.4.1 Vermehrung in verschiedenen Zellkulturen

KANDA und MELNICK (1959) untersuchten zahlreiche attenuierte und virulente Stämme aller 3 Poliomyelitisvirustypen auf ihre Vermehrungsfähigkeit bzw. auf das Plaquebildungsvermögen in der Monkey Stable (MS)-Zell-Linie, verglichen mit der Vermehrung in primären Affennieren (MK)-Zellkulturen und ihrer verminderten Vermehrungsfähigkeit unter reduziertem Bikarbonatgehalt des Agars (d-Charakter).

Die Infektiositätstiter der attenuierten Stämme betrugen auf MS Zellkulturen nur 1/100 der Titer, die auf MK Zellen erzielt wurden.

Virulente Stämme erreichten in beiden Zellkulturen sehr hohe Infektiositätstiter. Sie wurden MS^+ , attenuierte Stämme MS^- bezeichnet.

Nachdem 2 virulente MS^{+d+} Stämme nach 12 MS-Zellpassagen je 2 Affen intraspinal injiziert worden waren, riefen sie bei allen Tieren Paralyse hervor. Die Kombination MS^{-d+} (Saukett-Stamm) führte dagegen nur zu 10-20% Neurovirulenz. Damit konnte die genetische Verankerung dieser Marker bzw. -kombination gezeigt werden.

KOPROWSKI et al. (1960) benutzten diese Marker zusammen mit der Temperaturempfindlichkeit bei $37^{\circ}C$ und $40^{\circ}C$ (LWOFF u. LWOFF, 1958), um bei einer Polioepidemie in Leopoldville (1958-59), die gleichzeitig mit einem Vaccinierungs-Feldversuch ablief, das attenuierte Vaccinevirus von dem "wilden" Feldvirus zu unterscheiden. Die attenuierten Viren waren eindeutig von den virulenten auf Grund ihrer in-vitro Marker zu unterscheiden:

Tab. 2: Marker virulenter und attenuierter Polioviren
(nach KOPROWSKI et al., 1960)

	Marker				
	d	MS			Temperatur
	Zahl* d ⁺ d ⁻	Zahl* MS ⁺	MS [±]	MS ⁻	Zahl* 40 ⁺ 40/37 37 ⁺
virulent Mahoney (virul.)	1 1 -	1	1	-	1 1 -
Leopoldv. nicht geimpft	1 1 -	6	-	-	3 2 1
(virul.) Chat geimpft	2 2 -	4	-	-	4 4 -
Sickle	1 1 -	1	-	1	1 - 1
natürl.att. W 1063	1 - 1	1	-	1	- - -
attenuiert Chat	1 - 1	1	-	1	1 - -
attenuierte 1. Pass.	4 - 4	8	-	-	8 - -
humane 2. Pass.	1 - 1	1	-	1	1 - 1
Passagen 3. Pass.	1 - 1	1	-	1	1 - 1

* Anzahl der getesteten Stämme

BUYNAK und HILLEMANN (1966) testeten zwei attenuierte und einen virulenten Mumpsvirusstamm in verschiedenen primären Zellkulturen sowie auf der polyploiden Hela-Zelllinie. Beide attenuierten Stämme vermehrten sich im Gegensatz zum virulenten Stamm nicht in primären humanen Amnionzellen, dagegen erreichten sie in Hühnerembryo-fibroblastenzellkulturen (HEF) höhere Infektiositätstiters als der virulente Stamm.

Umfangreiche Untersuchungen über das Zellkulturspektrum sind bei Masernvirusstämmen unternommen worden, die im Zusammenhang mit in unterschiedlicher Form auftretenden Encephalitiden interessant geworden sind. SCHUMACHER et al. (1973) beschrieben dabei, daß sich nur attenuierte Masernstämmen in sekundären HEF-Kulturen vermehrten, während die nicht-attenuierten Stämme lediglich kleine, herdförmige Infektionen mit kaum meßbaren Titergrößen verursachten. Bei Züchtung dieser Stämme in Vero-Zellkulturen und in diploiden BSC-1 Kulturen konnten jedoch weder charakteristische Unterschiede in der Plaquemorphologie noch in der Art des auftretenden CPE festgestellt werden.

HAMILTON et al. (1973) konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Sie verglichen zwei Virusisolate von SSPE-Patienten mit dem niedrig passierten Edmonston-Stamm sowohl in Beziehung auf Cytopathologie und Plaquemorphologie als auch auf serologische Eigenschaften. Dabei stellten sie zwar ein unterschiedliches biologisches Verhalten der drei Stämme in Zellkulturen fest, schlossen aber daraus, daß die SSPE-Isolate genetische Varianten eines Masernstammes seien. Die Isolate zeigten das gleiche unterschiedliche zellbiologische Verhalten wie andere Masernstämmen.

Auch GORDIENKO et al. (1973) beschrieben ähnliche Ergebnisse und stellten fest, daß Änderungen genetischer Marker abhängig seien von der Art der Wirtszelle, der Temperatur und der durchgeführten Passagenzahl.

2.3.4.2 Plaquebildung

Wenn morphologisch unterschiedliche Verhaltensweisen zweier Virusstämme des gleichen Serotyps untersucht werden, erhebt sich die Frage, ob diese ein Ausdruck genetischer Unterschiede oder ein phänotypischer Ausdruck unterschiedlicher Umgebungsfaktoren sind. Dies gilt in besonderem Maß für die unterschiedliche Plaquebildung serotypisch gleicher Stämme.

CHOPPIN und EGGERS beobachteten 1962 in Titrationsen des Powers-Stammes von dem Coxsackie-B4-Virus, daß ein kleiner Prozentsatz von Plaques 7-10 mm Durchmesser mit runder, glatter Umgrenzung aufwies (als a^1 Virus bezeichnet). Die Mehrzahl der Plaques wies nur 1-2 mm Durchmesser und eine unregelmäßige, gezackte Umrandung in Affennierenzellen auf (a^S Virus). Nach zweimaliger Plaqueklonung beider Varianten änderte sich dieses Erscheinungsbild nicht mehr. Zugabe von 100 µg/ml DEAE-Dextran zum Agaroverlay ergab eine Zunahme der Plaquegröße von a^S Virus, während a^1 Virus unbeeinflusst blieb. Die kleine Plaquegröße von a^S Virus ist also durch einen Agarinhibitor bedingt (TAKEMOTO und LIEBHABER, 1961).

Zur Differenzierung von Herpes simplex Viren (HSV-1 und HSV-2) sind in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden. Dabei spielte das Verhalten in Zellkulturen, sowohl in primären als auch in Zell-Linien, eine große Rolle. FIGUEROA und RAWLS (1969) fanden, daß nicht-genitale Stämme (HSV-1) sich in Kaninchenzellkulturen besser vermehrten als aus dem Genitalbereich isolierte Stämme (HSV-2), jedoch nur bezogen auf die Zahl infektiöser Viruseinheiten. Die elektronenmikroskopisch bestimmte Gesamtzahl der Viruspartikel war bei beiden Typen annähernd gleich groß. Ihr Verhalten in HEF-Kulturen unterschied beide Typen jedoch deutlicher voneinander. Die

genitalen Stämme bildeten Plaques, im Gegensatz zu den oralen Stämmen. Außerdem erreichten sie Infektiositätstiter, die denen in Kaninchennierenzellkulturen entsprachen.

Bezogen auf die Gesamtzahl der Viruspartikel unterschieden sich beide Typen jedoch nicht in der Neurovirulenz für 3 Wochen alte Mäuse.

Die Plaquemorphologie beider Typen in HEF-Kulturen wurde von LOWRY et al. (1971) bestätigt. Sie fanden, daß bei den HSV-1-Stämmen die geringe Anzahl infektiöser Viruspartikel, die kleine Plaques bildeten, mit steigender Passage zunahm.

Da das Problem der Differenzierung von HSV in der Heterogenität der intratypischen Stämme liegt, verglich LEINIKKI (1973) 21 Stämme beider Typen nach Art des CPE, Plaquebildung in HEF Kulturen, Plaquegröße in heteroploiden Vero-Zellkulturen und in der indirekten Immunfluoreszenz. Dabei konnte der Autor mit Hilfe dieser biologischen Eigenschaften eine auch für atypische HSV-Stämme sichere Diagnostikmethode entwickeln. Vor allem die Plaquegröße in Vero-Zellen und die Immunfluoreszenz boten eine sichere Differenzierungsmöglichkeit (s. Tab. 3).

LOMNICZI (1974) kam bei einem anderen Herpesvirus, dem Virus der Aujeszky'schen Krankheit, zu vergleichbaren Ergebnissen. Die avirulenten Stämme bildeten in HEF-Kulturen keine, in PK-15 Zellkulturen nur sehr kleine Plaques. Ihre Infektiositätstiter in PK-15 Zellen waren jedoch höher als die der virulenten Stämme. Der CPE der virulenten Stämme zeigte sich in Form einer schnell einsetzenden Riesenzellbildung. Die Erklärung dieses Verhaltens der avirulenten Stämme liegt sowohl in der starken Induktion von Interferon als auch, wie LOMNICZI annimmt, in einer defekten DNA-Synthese dieser Stämme, einer Erscheinung, die schon von LOWRY et al. (1971) bei HSV-1 in HEF Kulturen beschrieben wurde.

Tab. 3: Eigenschaften und Typisierung von
versch. HSV Typ 1 und 2-Stämmen
(nach LEINIKKI, 1963)

Stamm Nr.	Art des CPE		PFU Vero/HEF	Plaque- größe in Vero	Imm.fluoreszenz	
	Rund- zellen	Riesen- zellen			Anti-1	Anti-2
1	+	-		klein	+	+
2	+	-	1900	"	+	+
3	+	-	2500	"	+	+
4	+	-	2500	"	+	+
5	+	-		"	+	+
9	-	+		"	+	+
10	+	-	1000	"	+	+
13	-	+	8000	"	+	+
15	+	-	200	"	+	+
16	+	-	2700	"	+	+
19	+	-	1200	"	+	+
21	+	-	1100	"	+	+
6	-	+	1,0	groß	-	+
7	-	+	1,0	"	-	+
8	-	+	1,0	"	-	+
11	-	+	1,0	"	-	+
12	+	-	0,4	"	-	+
14	-	+	1,4	"	-	+
17	+	-	0,9	"	-	+
18	-	+	0,3	"	-	+
20	-	+	0,5	"	-	+

Typ 1

Typ 2

PATTYN und VLEESSCHAUWER (1968) hatten eine große Plaque-variante (1) und eine kleine Plaquevariante (s) von dem Middleburg Virusstamm AR 749 isolieren können. Die gleichen Autoren (1968) konnten nun zeigen, daß beide Varianten unterschiedliche Virulenz für Mosquitos (*Aedes aegypti*) besaßen. Die ID₅₀ für Mosquitos lag für die s-Variante bei $5,5 \times 10^8$ PFU/ml des Blut-Virus-Gemisches, welches zur oralen Infektion für die Mosquitos diente. Die ID₅₀ für die l-Variante betrug nur 1×10^7 PFU/ml. Häufig konnte ein Wechsel vom l- zum s-Charakter einzelner Varianten nach Insektenpassage beobachtet werden. Es wurde angenommen, daß die l-Variante das "wilde" Virus repräsentierte.

WITTE und EASTERDAY (1967) prüften 4 Stämme von TGE-Virus auf ihre Vermehrungsfähigkeit in verschiedenen Zellkulturen. Nur der Purdue-Stamm konnte in Schweinenierenzellkulturen nach 6 Blindpassagen gezüchtet werden. Die 3 übrigen Stämme vermehrten sich nicht. Plaques wurden von dem Purdue-Stamm nach 4 Tagen gebildet, waren jedoch nicht immer reproduzierbar. In Schweineschilddrüsen (ST)-Zellkulturen vermehrte sich dagegen der Purdue-Stamm mit einem früh einsetzenden CPE und reproduzierbarer Plaquebildung.

BOHL und KUMAGAI (1965) dagegen hatten 6 Feld- und 3 attenuierte TGE-Stämme (Purdue, SH, NY II) verglichen, dabei aber kein unterschiedliches Verhalten der Stämme in Schweinenierenzellkulturen feststellen können.

BORGEN (1970) untersuchte 11 Rhinopneumonitisstämme auf ihr Verhalten in Schweinenieren (PK) - und Mäusefibroblasten (L)-Zellkulturen. Alle Stämme bildeten Plaques in PK Zellen. In L-Zellen produzierten jedoch der "Prevaccinol"- und der RAC-H-Stamm keine Plaques (L^-). Die vergeblichen Versuche polnischer Autoren, den RAC-H Stamm an Babymäuse zu adaptieren, korrelieren mit dieser Eigenschaft.

In einer neueren Arbeit haben DOUGLAS JR. et al. (1974) einen Zusammenhang zwischen Virulenz und Plaquegröße von Rhinovirus Typ 15, das 3mal in Wi-38 Zellen passiert war, festgestellt. Nach der Impfung von sog. "small plaque"-Varianten wurde eine Prävalenzrate von 60%, bei "large-plaque"-Varianten dagegen nur von 20% erzielt. Die Antikörperbildung war bei beiden Gruppen jedoch ähnlich.

2.3.5 Antigenetische Unterschiede

2.3.5.1 Neutralisationskinetik

GARD (1960) versuchte, ausgehend von den Ergebnissen von MC BRIDE (1959) und WENNER (1956), eine einfache Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe man homologe und heterologe Virusstämme, in seinem Fall Polio Typ-1 Stämme, unterscheiden konnte. Die Untersuchungen wurden mit Antisera gegen 3 Polio Typ-1 Stämme, Anti-Chat, Anti-Liku und Anti-Mahoney, durchgeführt. Er benutzte eine Serumendkonzentration von 1:10000, die sich in Vorversuchen als zwischen homologen und heterologen Endtitern liegende Verdünnung erwiesen hatte. Die Viruskonzentration betrug 10^3 KID₅₀/ml und die Inkubationszeit 6 Std. bei 37° C. Nach 1:10 Verdünnung wurden die jeweiligen Virus-Serumgemische auf Affennierenzellkulturen austitriert. In diesen Versuchen mit 17 attenuierten und 8 wilden Stämmen konnte er nur eine grobe Einteilung in homologe, intermediäre und heterologe Stämme auf Grund des CPE treffen. Lediglich eine homologe Reaktion, d.h. fehlender CPE, ließ mit Sicherheit auch auf einen homologen Stamm schließen.

WECKER (1960) entwickelte eine Plaqueteknik, in der das Immuns Serum dem Agaroverlay zugefügt wurde. Dadurch wurde nur das aus den primär infizierten Zellen freigesetzte Virus dem Immuns Serum ausgesetzt. Der Unterschied in der Plaquetegröße zwischen Immuns Serum-behandelten und unbehandelten Kulturen diente als Maßstab für die antigenetischen Unterschiede verschiedener Poliovirus Typ-1 Stämme. Er benutzte ein Anti-Chat-Immuns Serum in verschiedenen Verdünnungsstufen und ließ es gegen den homologen Chat-Stamm sowie gegen 10 andere Stämme bzw. Isolate, die von einer Epidemie in Leopoldville stammten, neutralisieren. Nur die

Isolate, die von in-vivo Passagen des Chat-Stammes stammten, zeigten Übereinstimmung mit dem Verhalten des Chat-Stammes, d.h. sie wurden vollständig neutralisiert. Alle anderen Isolate bildeten 23-48% der durchschnittlichen Plaquegröße unter Anti-Chat-Serum gegenüber der Plaquegröße in Kontrollen.

Die Ergebnisse wurden durch andere Markerteste bestätigt: d-Charakter, MS-Charakter und Temperaturmarker (LWOFF und LWOFF, 1958):

Voraussetzung für die genaue Reproduktion der Ergebnisse mit dieser Methode waren:

1. Immunserum muß gegen das Plaque-gereinigte Virus hergestellt sein.
2. Die Plaquegröße darf in benachbarten Plaqueschalen nicht zu stark differieren.

PLOTKIN et al. (1961) entwickelten schließlich einen nach WECKER (1960) modifizierten "Intratypischen Serodifferenzierungstest" (IST). Beim IST wird der Quotient aus Plaquezahl unter Immunserumoverlay (N_g) und Plaquezahl unter Normaloverlay (N_c) mit dem Quotienten aus größtem Plaque-durchmesser unter Immunserum- (D_g) und größtem Plaquedurchmesser unter Normaloverlay (D_c) multipliziert, um die IST-Rate (R_{IST}) zu erhalten. Sie drückt die Neutralisationsfähigkeit eines Immunserums gegen verschiedene Virusstämme des gleichen Serotyps aus. War die Differenz der R_{IST} -Werte des unbekannten und des Prototypvirus kleiner als $1/3$ der Differenz des Prototypvirus und des heterologen Virus, so wurde der Stamm als homolog, war sie größer als $2/3$ als heterolog bezeichnet. Dazwischen liegende Werte galten als intermediär. Mit diesem Test konnte nachgewiesen werden, daß einige attenuierte Poliovirusstämme in der humanen Darmpassage ihre antigenetischen Merkmale ändern, andere dagegen nicht.

OZAKI et al. (1962) benutzten die Neutralisationskinetik für eine epidemiologische Arbeit, bei der sie prä- und postvaccinale Poliovirusisolate auf ihre Neutralisationskonstante hin untersuchten. Diese Konstante errechnete sich aus folgender Formel: $K = (D/t) \times 2,3 \log (V_o/V_t)$ (D = reziproke Serumverdünnung; t = Reaktionszeit; V_o = Infektiosität bei t_o ; V_t = Infektiosität bei Ende der Reaktionszeit; nach MC BRIDE, 1959).

Mit dem genormten K-Wert (NK), bei dem das homologe Virus-Serumgemisch den Wert 100 erhält, konnten die Autoren unterscheiden, ob sich ein Virusisolat dem zur Vaccinierung benutzten Virusstamm antigenetisch ähnlich oder nicht ähnlich verhielt. Es zeigte sich in dieser Untersuchung, daß alle vor der Impfung isolierten Stämme unterschiedliche K-Werte zum Impfstamm aufwiesen, während die postvaccinalen Isolate antigenetisch teils ähnlich teils nicht ähnlich reagierten. Diese Art der Untersuchung läßt wichtige epidemiologische Schlüsse in Bezug auf die Durchseuchung einer Population im Verlauf eines Impfprogrammes zu.

HAFEZ und LIESS (1972) haben diese Methode etwas modifiziert benutzt, um verschiedene BVD-Virusstämme antigenetisch unterscheiden zu können. In Vorversuchen bestimmten sie die Verdünnung eines Hyperimmunserums, die 90% einer gegebenen homologen Virusmenge in 60 Min. bei 37° C neutralisierte. Eine 1:10 Verdünnung dieser Serumverdünnung diente als Gebrauchsserum. Die Virusgebrauchsdosis betrug 5×10^5 PFU/ml.

Die verbliebene Restinfektiosität wurde im Plaquetest bestimmt, prozentual zur t_o -Infektiosität errechnet und halblogarithmisch gegen die Zeit aufgezeichnet. K- und NK-Werte wurden nach MC BRIDE'S Formel errechnet. Dabei konnte festgestellt werden, daß alle untersuchten Stämme antigenetisch heterolog reagierten.

In einer vergleichenden Untersuchung unter Rekombinanten von Influenza A_0 und $-A_2$ Elternstämmen konnten KILBOURNE et al. (1967) mit Hilfe verschiedener Markertests Rückschlüsse darüber ziehen, ob F_1 -Rekombinanten noch elterliche Eigenschaften besaßen oder von dem Austausch dieser Eigenschaften auf die Elternstämme schließen. Dabei konnten sie vor allem mit Hilfe des "Plaque-Size-Reduction" (PSR) Markers (WECKER, 1960) die A_2 -Komponente der Rekombinanten identifizieren. Mit dem spezifischen A_2 -Antiserum zeigten alle Rekombinanten eine deutliche Reduktion der Plaquegröße, jedoch konstante Plaquezahlen, während mit A_0 -Antiserum eine komplette Kreuzneutralität bzw. Plaque-Reduktion auftrat. Sie konnten gleichzeitig eine Beziehung zwischen Neuraminidaseaktivität und PSR-Marker bzw. KBR sowie zwischen Hämagglutinin und HAH-Test bzw. Plaque-Reduktion aufzeigen. Dabei stellte sich der PSR-Markertest als wesentlich feinfühlicher in der Identifizierung der einzelnen Antigenkomponenten der Rekombinanten heraus als HAH- oder Neutralisationstest.

CHOPPIN und EGGERS (1962) stellten als wichtigstes Unterscheidungsmerkmal der von dem Cocksackie-B 4 Powers Stamm entwickelten beiden Varianten ihre unterschiedliche Antikörperempfindlichkeit heraus: a^S = sensibel; a^i = unsensibel.

In niedrigen Zellkulturpassagen traten vermehrt a^i -Varianten auf, bei höheren dagegen vorwiegend a^S . Das bedeutete, daß die Antikörpertiter mit a^i -Virus sehr niedrig blieben, mit a^S -Virus dagegen hohe Titer erreicht wurden. Ein ähnliches Verhalten gegenüber Antikörpern wurde auch bei anderen Virusarten gefunden, z.B. Influenza-A 2 (CHOPPIN und TAMM, 1960), bei ECHO 6-Viren (BARRON und KARZON, 1961). Als Ursache wurden gleiche grundlegende Unterschiede im Virusoberflächenprotein diskutiert.

PERVIKOV et al. (1973) versuchten die intratypische Differenzierung von Poliovirus Typ-1 Stämmen mit Hilfe von aufgetrennten Ig M- und Ig G-Antikörpern zu erreichen. Gegen den LSc 2ab-Polioimpfstamm wurde in Kaninchen Hyperimmunserum hergestellt. Nach Gelfiltration (Sephadex G-200) und Ionen-Austauschchromatografie mittels DEAE-Zellulose zur Gewinnung der Ig M-Fraktion des Immunserums sowie DEAE-Sephadex A-50 Elution der Ig G-Fraktion, wurden sowohl die gereinigten Immunglobuline als auch das Gesamtimmunserum zur Neutralisationskinetik homologer und heterologer Poliovirus Typ-1 Stämme verwendet. Die Autoren konnten keinen signifikanten Unterschied in der Neutralisationsfähigkeit der beiden Ig-Fractionen gegenüber Poliovirus Typ-1 Stämmen feststellen.

2.3.5.2 Immunogenität

TRIBE et al. (1973) fanden für Hepatitis contagiosa canis (HCC) Virus einen eleganten Marker, mit dem sie attenuierte von virulenten Stämmen trennten. 10 untersuchte Seren von Hunden, die eine natürliche Infektion überstanden hatten, zeigten im Gel-Diffusionstest zwischen dem 10. und 21. Tag p.inf. eine deutliche Präzipitationsreaktion gegen beide "wilden" Virusstämme. Ein in 53 Hundenieren- und 23 Schweinenierenzellkulturpassagen attenuierter HCC-Stamm erzeugte dagegen keine sichtbare Präzipitation. Nur wenn die Virusmenge auf 10^9 KID₅₀/ml erhöht wurde, trat eine schwache Reaktion auf. Seren von 10 mit diesem Stamm geimpften Hunden zeigten keine Fällungsreaktion mit einem der 3 Antigene (ausgenommen 2 schwache Reaktionen). Der attenuierte Stamm hatte also in starkem Maße seine Fähigkeit verloren, im Wirtsorganismus präzipitierende Antikörper zu induzieren. Mit diesem Verfahren war er gut von Feldvirusstämmen zu unterscheiden.

Zur Unterscheidung von Rubellavirusstämmen sind erste Untersuchungen von HUYGELEN und PEETERMANS (1967) berichtet worden. Hoch attenuierte Stämme induzierten im Kaninchen nach i.m.-Injektion keine Antikörperbildung im Gegensatz zu Feldvirusstämmen.

LONDON et al. (1971) erhielten das gleiche Ergebnis nach intravenöser Infizierung. Nach einer Feldvirusinfektion konnten sie das Virus in der Regel über den Kehlkopf der Kaninchen reisolieren, nach Infizierung mit dem Impfvirus gelang dies nie.

OXFORD und POTTER (1970) stellten zusätzlich fest, daß der von einem humanen Impfling reisolierte Impfvirusstamm sein reduziertes Antikörperbildungsvermögen im Kaninchen behalten hatte. Dieser genetisch fixierte Marker wurde von LINNEMANN et al. (1974) sowie von GILL und FURESZ (1973) bestätigt.

BOHL et al. (1972) berichteten über eine unterschiedliche Immunantwort nach verschiedenen Infizierungsarten mit attenuierten, virulenten und inaktivierten TGE-Stämmen. Nach 2maliger intramuskulärer Injektion von lebendem, attenuiertem Virus fiel der Antikörpertiter in der Milch wenige Tage post partum stark ab, genauso wie nach intramammärer Injektion von inaktiviertem, hoch passiertem Virus. Alle Ferkel starben nach einer Testinfektion mit virulentem Virus nach 2 Tagen.

Nach natürlicher, oraler Infektion der Sau war der Antikörperspiegel in der Milch wesentlich höher als im Serum und fiel nur allmählich ab, genauso wie nach künstlicher, oraler Infizierung mit virulentem Virus. Alle Ferkel überlebten eine Testinfektion mit 200 Schweine-infektiösen Einheiten eines virulenten Stammes. Gleichzeitig konnten die Autoren mit Hilfe der Säulenchromatographie (Sephadex-G-200) sowie anschließender Neutralisationsteste der ein-

zelnen Eluate und Ig-Bestimmung mit der Gelpräzipitation feststellen, daß nach oraler Infektion hauptsächlich Ig-A Antikörper gebildet wurden. Eine intramammäre und intramuskuläre Injektion induzierte dagegen in erster Linie Ig-G Antikörper.

Diese Ergebnisse wurden von RISTIC und ABOU-YOUSSEF (1972) bestätigt, die die gleiche immunogenetische Heterogenität zwischen Darmisolaten und zellkultur-adaptierten Stämmen beschrieben, wobei letztere ebenfalls nur Ig-G induzierten.

Da nur Ig-A Antikörper die Azidität des Magendarmtraktes zu überstehen und folglich Virus im Darm zu neutralisieren vermögen, kommt diesem immunologischen Marker große Bedeutung im Hinblick auf die Entwicklung einer erfolgreichen Impfmethode gegen TGE zu.

2.3.6 Interferonproduktion und -sensibilität

Die Interferonproduktion verschiedener Virusstämme wird in zunehmendem Maße als Unterscheidungsmerkmal zwischen attenuierten und virulenten Stämmen besonders in Bezug auf ihre Virulenz herangezogen.

SELLERS (1963) untersuchte einen virulenten und einen attenuierten MKS Typ O-Stamm auf überlebendem bovinen Zungenepithel im Hinblick auf seine Interferonproduktion. Dabei zeigte der attenuierte Stamm einen abortiven Vermehrungszyklus im Gegensatz zum virulenten Stamm, der sich mit hohen Infektiositätstitern in den Zungenepithelkulturen vermehrte. Der Autor erklärte diesen abortiven Vermehrungszyklus mit der sehr hohen Rate (95-98%) von nicht-infektiösem Virus. Die nicht-infektiöse Viruspopulation stimulierte in der Zelle die Produktion von Interferon und blockierte damit die Replikation der 2-5% des infektiösen Virus. Interferon wurde auch bei der Vermehrung des virulenten Stammes in geringem Maß nachgewiesen.

Diese Erklärung der unterschiedlichen Interferoninduktion der beiden Stämme stimmt mit HENLE (1963) überein, der beim Studium der permanenten ND-Virusinfektion in L-Zellen zu ähnlichen Ergebnissen kam. DE MAEYER und ENDERS (1964/65) bestätigten beim Vergleich zweier Masernvirusstämme diese Befunde. Der in HEF-Kulturen hochattenuierte Stamm (Edmonston) wies doppelt so hohe Interferontiter auf wie der virulente Stamm.

LOMNICZI und BURKE (1970) fanden, daß alle 21 temperaturempfindlichen (t_s) Mutanten von Semliki-forest-Virus, die sie untersuchten, Interferon induzierten, obwohl viele Mutanten keine infektiöse RNS bilden konnten (RNA^-). Hohe Dosen nicht-infektiöser RNS stellten einen Interferoninducer dar.

LOMNICZI (1973) untersuchte ND-Virus auf Interferonproduktion und -sensibilität. Velogene und mesogene NDV-Stämme, die Hühnerembryonen töteten, produzierten nach Verimpfung in die Allantoishöhle höhere Interferontiter im bebrüteten Hühnerei als lentogene Stämme. Nach Interferonvorbehandlung (80 I.U., 20 Std. prae inf.) von primären HEF-Zellkulturen sank die Interferonproduktion der Zellen mit fallender "input multiplicity" bei lentogenen Stämmen rapide ab. Bei meso- und velogenen Stämmen war dieser Abfall dagegen auch bei sehr niedriger Virus/Zellrelation stark abgeschwächt. Nach UV-Inaktivierung bildeten alle Stämme vermehrt Interferon. Der Autor vermutete, daß infektiöses NDV zwei Arten von Inhibitorproteinen bildete: eines, das die Bildung von Interferonproteinen hemmte (dieser Inhibitor wird von virulenten Stämmen nicht gebildet), und ein anderes, das die zelluläre Proteinsynthese ausschaltete (wird von avirulenten Stämmen nicht gebildet).

Bei Pseudorabies-Virus (LOMNICZI, 1974) zeigte sich, daß nur avirulente Stämme in jungen HEF-Kulturen Interferon

induzierten. In älteren Kulturen bildeten auch einige virulente Stämme Interferon. Bei sehr geringen Infektiositätsmengen pro Zelle verursachte eine Interferonvorbehandlung (80 I.U., 12 Std. prae inf.) der Zellen einen wesentlich größeren Interferontiterabfall bei avirulenten Stämmen als bei virulenten.

SCHUMACHER et al. (1972) konnten dagegen zwischen virulenten und attenuierten Masernvirusstämmen keine Unterschiede in der Fähigkeit Interferon in bestimmten Zellkulturen zu induzieren, finden.

2.4 Physikalische und chemische Marker

Physikalische und chemische Marker eines Virusstammes sind der Ausdruck für ein genetisch fixiertes Verhalten dieses Stammes bestimmten physikalischen und chemischen Einflüssen gegenüber. Die Methoden, mit denen ein solches Verhalten untersucht wird, gehören zu den Standardmethoden der virologischen Praxis, denen jedes neu isolierte Virus unterzogen wird, bevor es klassifiziert werden kann. Deshalb können die hier aufgeführten Arbeiten nur einen exemplarischen Charakter haben.

2.4.1 Temperatur, Formalin, UV-Bestrahlung, pH-Wert Veränderung

CARP und KOPROWSKI (1962 b) konnten mit Hilfe des "Reproductive Capacity Temperature (RCT)"-Markers verschiedene Poliovirusstämme unterscheiden. Adsorption und Eklipse waren bei dem hochattenuierten Chat-Typ 1 Stamm bei 40° C gegenüber 37° C nicht verändert. Die Produktion von infektiöser RNS war bei 40° C jedoch deutlich inhibiert (RCT/40⁻) im Gegensatz zu dem virulenten Mahoney-Typ 1 Stamm, dessen RNS-Produktion bei 40° C sogar deutlich erhöht war (RCT/40⁺). Wurden die Kulturen mit Deuteriumoxid (50% D₂O im Overlay) behandelt, vermehrte sich auch der Chat-Stamm bei 40° C und produzierte 10-70% der Plaques, die er gewöhnlich bei 37° C bildete.

Gleichzeitig entwickelten beide Autoren (1962 a) einen einfacheren "Limited Thermal Exposure" (LTE) Test, bei dem die Inkubation für bestimmte Zeitperioden auf 40° C erhöht wurde. Dabei wurde das Verhältnis von Plaquezahl unter erhöhter Temperatur zu der unter Normaltemperatur als r-Wert ausgedrückt. Es traten jedoch bei jedem Stamm starke Schwan-

kungen auf, so daß er in Bezug zu den LTE-Werten von standardisierten, attenuierten und virulenten Stämmen gesetzt wurde (R-Wert).

Stämme, die R-Werte von 0-30, 30-60 und 65-100 aufwiesen, wurden als attenuiert, intermediär und virulent bezeichnet. Dieser Test eignete sich zur Differenzierung von Poliostämmen aller 3 Typen. Auch geringe Schwankungen der Temperatur konnten den Aussagewert der Ergebnisse nicht wesentlich beeinflussen.

Daß durch hochgradige Passagierung eines Virus in bestimmten Zellkulturen die Resistenz dieses Virus auch chemischen und physikalischen Einflüssen gegenüber abgeschwächt wird, konnten MAYR et al. (1961) mit Dauerkulturpassagen von Teschener Virus (Stamm Konratice) zeigen. Die 4. Schweinenierenkulturpassage dieses Stammes hatte nach 30 Minuten Inaktivierungszeit bei 56° C noch einen Infektiositätstiter von 4,5 KID₅₀/0,1 ml (Ausgangstiter: 7,25 KID₅₀/0,1 ml). Während die 220. Passage nach 30 Minuten Inaktivierung noch 1,5 KID₅₀/0,1 ml besaß, war die 420. Passage nach dieser Zeit bereits vollständig inaktiviert. Dieser hochpassierte Stamm sedimentierte auch etwas langsamer im D₂O-H₂O Dichtegradienten als das Virus der niedrigen Passagen, was auf Veränderungen der Proteinstruktur des Virus schließen ließ.

BENGTSSON et al. (1963) kamen im gleichen Test mit den MKS Typen A und O bei über 700 maliger Passage in Kälbernierenzellkulturen nach 15 Minuten Inaktivierung bei 56° C zu ähnlichen Aussagen. Bei Typ C war jedoch der Titerabfall des hochattenuierten Stammes nicht so deutlich (357. Passage).

Die Hitzestabilität der virulenten MKS Stämme stand in enger Korrelation zu der Säurestabilität bei pH 6,5: auch hier waren die virulenten Stämme resistenter als die attenuierten. Die Adaptierung und Attenuierung eines

Virusstammes an und in einer Zellkultur kann jedoch auch die Bildung Hitze-resistenter Stämme fördern, wie ALBRECHT und SCHUMACHER (1971) mit dem an Hamstergehirn adaptierten Masernvirusstamm HNT zeigten. Nach 5 Verozellkulturpassagen besaß dieser Stamm nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 45° C nur eine Rest-Infektiosität von 0,2% der Inokulierungsinfektiosität.

Nach 38 Passagen war dieser Prozentsatz auf 70-80% gestiegen. Auch bei den Stämmen Edmonston, Mantooth, ROSSPE-1 und Edmonston B wurde eine Steigerung der Hitze-resistenz von der 2. zur 5. Kulturpassage in Verozellen beobachtet, jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei dem HNT-Stamm.

WALLIS und MELNICK (1963 a) entwickelten eine Methode, mit der sie aus einer virulenten Poliovirus Typ 1 (Mahoney)-Population mit Hilfe von Al⁺⁺⁺ und Hitzebehandlung (50° C, 15 Min.) einen attenuierten Stamm selektierten, dessen Neurovirulenz für Affen deutlich vermindert war. Der virulente Mahoney-Stamm wurde über 10 Passagen lang in einer 10 mM Al Cl₃-Lösung 15 Minuten bei 50° C erhitzt und auf Affennierenzellkulturen verimpft. Dann wurde er noch in jeweils 5 Passagen a) mit 4maliger Al-Hitzebehandlung pro Passage und b) als Kontrolle ohne Al-Hitzebehandlung passiert. Es zeigte sich, daß der hitzeresistente selektierte Stamm seine Virulenz fast verloren hatte. Nach der 15. Passage war er in einer Dosis von 10⁸ PFU/ml avirulent für Affen. Nach den 5 Kontrollpassagen hatte er jedoch seine ursprüngliche Virulenz für Affen wiedererreicht. Dieser sogenannte A-Marker war also genetisch nicht stabil.

MAASAB (1970) entwickelte durch Adaptation und chemische Mutagene sogenannte "kalte" Varianten von Influenza A und B, die sich bei 25° C vermehrten. Im RCT-Test (SABIN, 1960) zeigten die "kalten" B-Varianten eine größere Temperatur-

empfindlichkeit als die "kalten" A-Varianten, die sich bei 25°, 33° und 35° C mit ähnlichen Infektionstitern vermehrten. Der durch das chemische Mutagen 5-Fluorouracil erhaltene temperaturempfindliche WSN-Stamm bildete bei 39,5° C in primären Hühnernierenkulturen keine Plaques mehr. Diese Fähigkeit war bei 34° C noch erhalten. Der Autor untersuchte daneben vergleichsweise den d-Charakter, d.h. die Säureempfindlichkeit (VOGT et al., 1957) dieser Stämme. Bei pH 5,7 - 6,3 zeigte der "kalte" Stamm einen HA-Titerabfall um 4 Stufen bzw. einen Infektiositätstiterverlust von $10^{2,5} \text{KID}_{50}$. Der "wilde" Originalstamm erreichte dagegen in saurem Medium gleiche Infektiositätstiter wie bei pH 7,6-7,8. Diese verschiedenen Marker waren auch nach 10maliger Passage in primären Hühnernierenkulturen und Mäusen noch stabil:

Tab. 4: Marker zur Differenzierung der "kalten" Variante des Influenza Typ-A Virus von dem Originalstamm (nach MAASAB, 1970)

	kalte Variante	Originalstamm
pH-Empfindlichkeit	empfindlich bei pH 6	unempfindlich
RCT/41°	keine Vermehrung	Vermehrung bei 36° und 41° C
PlauegröÙe bei 36° C	kleiner als 3 mm	gröÙer als 4 mm
PlauegröÙe bei 25° C	3-4mm	keine Plaues

GHENDON et al. (1970) fanden darüber hinaus in einem interessanten Versuch, daß genetisch stabile Marker, in diesem Fall der ts_{40} -Marker von Vaccinia-Virus, unter dem Einfluß inaktivierender Substanzen wie Formaldehyd und UV-Strahlen ihr genetisch fixiertes Verhalten, d.h. Thermostabilität bzw. -labilität bei 40° C, verändern konnten. Es wurden gleiche Teile einer inaktivierten ts_{40} -Mutante mit einer aktiven ts_{40} -Mutante von Vaccinia-Virus gemischt

und unter dem Einfluß von UV-Strahlen, Formaldehyd (1:3500), 4M-Salpetersäure, 1M-Hydroxylamin und Methylenblau eine bestimmte Zeit inkubiert. Dabei ergab die UV- und die Formaldehydbehandlung eine teilweise Reaktivierung der inaktivierten ts_{40}^{+} -Mutanten. Die Infektiositätstiter betrugen bei 40° C 2,3-3,0 bzw. 1,7-2,1 KID₅₀/ml.

Mit den 3 übrigen Chemikalien lag der Titer unter 1,0. Diese genetische Interaktion ist immer dann zu berücksichtigen, wenn man mit verschiedenen Markern arbeitet, die im Genom eng beieinander liegen.

PARKER et al. (1969) stellten bei der Attenuierung von Wesselbron-Virusstämmen in Lammnierenzellkulturen fest, daß die hochpassierten Stämme (110. Passage) thermolabiler waren und zudem nach Inkubation bei einem pH-Wert von 6,1 keine Hämagglutination mehr zeigten, während die Stämme in der 12. Passage einen HA-Titer von 1:10.240 aufwiesen.

2.4.2 Sedimentation in Dichtegradienten

PARKER et al. (1969) stellten darüberhinaus für Wesselbron-Virus fest, daß die virulenten Stämme bei einer Dichte von 1,225-1,238 g/ml im CsCl-Gradienten ihre höchste Infektiosität besaßen. Die attenuierten Stämme sedimentierten bei 1,25 g/ml. Diese unterschiedliche Sedimentation ließ auf eine veränderte Struktur der Virushülle schließen (fehlende Lipide), die auf die zahlreichen Zellkulturpassagen zurückgeführt wurde.

MAYR et al. (1961) stellten bei der Sedimentation des Teschener Stammes Konratice fest, daß der hochpassierte Stamm im D₂O-H₂O Gradienten langsamer sedimentierte als der wenig attenuierte.

Die Sedimentation von Poliovirus Typ-1 Stämmen untersuchten BENGTTSSON et al. (1964) in Dichtegradienten von Dextransulfat (DS) und Diäthylaminoäthylen-Dextran (DEAE). Die Sedimentation in diesen Gradienten ist infolge der unterschiedlichen Ionisierung dieser Lösungen pH-Wert abhängig. In DS sedimentierte der attenuierte Stamm LSc 2ab bei pH 7,0 langsamer als der virulente Stamm E 206, ebenso wie bei pH 8,0 im DEAE-Gradienten, während der Unterschied bei pH 7,0 in diesem Gradienten nicht deutlich war.

2.4.3 Verhalten gegenüber Polyanionen

HODES et al. (1960) ließen einen virulenten (Mahoney) und einen attenuierten (LSc 2ab) Poliovirusstamm eine Säule von DEAE-Zellulose durchlaufen. Dabei konnten sie 94% des virulenten Stammes wieder aus dem Durchlauf zurückgewinnen, während von dem attenuierten Stamm nur 0,8% zurückerhalten wurden. Zusätzlich wurde ein aus dem Kot eines mit LSc 2ab vaccinierten Kindes gewonnenes Reisolat geprüft, bei dem 10% des Virus aus dem Durchlauf zurückerhalten wurde. Gleichzeitig wurde bei diesem Isolat eine für Affen angestiegene Neurovirulenz nach humaner Darmpassage festgestellt. Es läßt sich also aus diesen Ergebnissen mit einiger Sicherheit ein Rückschluß auf die fehlende genetische Stabilität des verwendeten Impfstammes ziehen.

WALLIS und MELNICK (1962) konnten durch Zugabe von 25 mM Mg Cl₂ zum Erhaltungsmedium verschiedener Poliostämme bei attenuierten Typ-1 und Typ-2 Impfstämmen einen um das 10fache erhöhten Titer gegenüber normalem Erhaltungsmedium erzielen. Der attenuierte Typ-3 Stamm und die virulenten Stämme aller 3 Typen zeigten dagegen kaum einen

Titeranstieg. Eine Steigerung der Plaquezahl unter festem Overlay war jedoch bei keinem Stamm festzustellen. Der Effekt der Anionen scheint bei niedriger Viruskonzentration in einer gesteigerten Einschleusung des Virus in die Zelle (Affennierenzellen) begründet zu sein.

Seit Einführung der Plaquetechnik als einer häufig verwendeten Routinemethode in der Virologie gibt es zahlreiche Untersuchungen über unterschiedliche Virusvermehrung unter den verschiedenen benutzten Overlays.

LIEBHABER und TAKEMOTO (1961) berichteten über 2 Varianten von Encephalomyocarditis (EMC) Virus, von denen der "wilde" Stamm auf Mäusefibroblasten (L)-Zellkulturen nach 4 Tagen kleine Plaques (1 mm; r^+) bildete. Die Autoren konnten aus dem Agaroverlay ein Polysaccharidsulfat isolieren, das für diesen Unterschied in der Plaquegröße verantwortlich war. Die Hemmung von r^+ -Stämmen durch das Sulfat konnte jedoch nur bei einer "input multiplicity" von 0,001 gezeigt werden.

Ebenso waren die Infektiositätstiter in Gegenwart dieses Sulfats bei r -Stämmen um den Faktor 100 gegenüber r^+ -Stämmen erhöht. Wurde dagegen das Sulfat erst nach Adsorption des Virus zugefügt, konnte keine Beeinflussung von Plaquegröße bzw. Infektiositätstiter mehr beobachtet werden. Durch Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ DEAE-Dextran zum Overlay konnte der Effekt aufgehoben werden.

In einer folgenden Arbeit konnten LIEBHABER und TAKEMOTO (1963) zeigen, daß dieser Effekt durch die unterschiedliche Bindungsfähigkeit beider Stämme an Na-Polysaccharid bedingt war. Diese Bindung ist abhängig von der Konzentration des Polysaccharids, vom pH-Wert und der Ionenstärke. Der r -Stamm wird fast nicht von polymeren Sulfaten gebunden, während der r^+ -Stamm unter normalen Plaquetestbedingungen vollständig gebunden wird. Gebildetes Virus der r^+ -Stämme bleibt an die Sulfate des Overlay gebunden. Die Plaquebildung ist folglich verzögert.

Die Aufdeckung dieser Wirkungsweise von bestimmten Agar-komponenten läßt den von VOGT et al. (1957) beschriebenen d-Marker (Virusvermehrung unter saurem-pH 6,8-Overlay) in neuem Licht erscheinen. TAKEMOTO und LIEBHABER (1962) sowie AGOL und CHUMAKOVA (1962) konnten zeigen, daß die als d-Marker bezeichnete Eigenschaft bestimmter Poliovirus-stämme der oben als r^+ bezeichneten Eigenschaft entspricht.

Einen Dextransulfat (DS) Marker konnten DZHIVANYAN et al. (1970) bei verschiedenen Stämmen von Zeckenencephalitis-Viren beobachten. Sie konnten in einer Zell-Linie von Schweineembryonierenzellen nach 12 Tagen Inkubationszeit S^+ Stämme (Plauegröße über 3 mm) von S^- (Plauegröße kleiner als 1 mm)-Stämmen trennen.

Unter den S^+ -Stämmen fanden sich nach Zugabe von 200 ug/ml Dextransulfat im Overlay 6 Stämme, die deutlich kleinere Plaques bildeten und als DS^- bezeichnet wurden. Die übrigen Stämme veränderten ihre Plauegröße auch nach Zugabe von DS nicht. Dieser Marker blieb auch nach zahlreichen Passagen in Babymäusen stabil.

Interessant war die Beobachtung von DZHIVANYAN et al. (1974), daß die Isolate von gleichen Zeckenarten auch durch gleiche DS-Marker gekennzeichnet waren, auch wenn die Zeckenarten in weit voneinander entfernten Regionen vorkamen. Dieser Zusammenhang betraf jedoch nur S^+ -Stämme.

WALLIS et al. (1966) konnten mit Na-Dextransulfat, DEAE-Dextran und Protaminsulfat bei Enteroviren keine veränderte Plauegröße nachweisen. Unter Zugabe von 0,025 M $MgCl_2$ vergrößerten sich die Plaques verschiedener Polio- und Coxsackieviren um das 2-3fache, bei Rhinoviren um das 1-3fache. Sie führten diesen Unterschied auf die Verwendung von Difco-Agar zurück.

Über eine unterschiedliche Empfindlichkeit von virulenten und attenuierten Poliovirustämmen vom Typ 1 auf Zugabe von 2% Polyäthylenglykol (MW 40000) ins Agaroverlay berichteten schließlich LOKTEVA et al. (1972). Alle attenuierten Stämme zeigten entweder eine vollständige oder 20-50fache Hemmung der Plaquebildung und wurden als PG^- bezeichnet. Die 14 untersuchten virulenten Stämme waren alle PG^+ , die Plaquegröße war jedoch auch bei diesen Stämmen deutlich reduziert. BALAYAN et al. (1969) erklärten diesen Effekt mit der Eigenschaft virulenter Poliovirustämme unter dem Einfluß von Polyanionen nach der Freisetzung aus der Zelle nicht zu aggregieren und so leichter ins Overlay einzudringen und Plaques zu bilden, während attenuierte Stämme zur Aggregation neigen. Auch FISZMAN et al. (1971) berichteten über eine starke Aggregationsneigung des attenuierten LSc 2ab-Stammes unter bestimmten Bedingungen. Eine ähnliche Beeinflussung der Aggregation der Viruspartikel wurde durch Polyäthylenglykol angenommen.

2.4.4 Wirkung von Farbstoffen

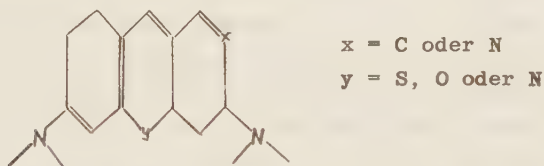
Daß einige Viren in Gegenwart bestimmter Farbstoffe photodynamisch inaktiviert werden, ist schon seit über 40 Jahren bekannt (CLIFTON, 1931) und wurde seitdem von zahlreichen Autoren beschrieben.

Erst in jüngerer Zeit wurde berichtet, daß diese Farbstoffe auch in Abwesenheit von Licht eine inhibierende Wirkung auf die Virussynthese haben können (DINTER und DIDERHOLM, 1971).

2.4.4.1 Photoinaktivierung

Der photodynamische Vorgang besteht aus der Aufnahme von Lichtenergie durch den Farbstoff und der Vermittlung dieser Energie durch molekularen Sauerstoff, um die Inaktivierung biologisch aktiven Materials zu erreichen. Nur solche Farbstoffe, die reduziert werden können, fungieren als Vermittler der Inaktivierungsenergie (OSTER et al., 1959).

Vergleicht man die Strukturformeln z.B. von Neutralrot und Proflavin, so kommt man zu der allgemeinen Formel eines photodynamisch-aktiven Farbstoffes:



CROWTHER und MELNICK (1961) berichteten, daß Poliovirus Neutralrot (bis 5 µg/ml) ebenso wie Acridinorange wahrscheinlich an die Nukleinsäure bindet und dadurch photosensitiv inaktiviert wird. Die Farbstoffe wurden jedoch nur während der Replikation des Virus eingebaut. Der Effekt trat nicht ein, wenn das infektiöse Virus allein mit den Farbstoffen inkubiert und dem Licht ausgesetzt wurde (SCHAFER, 1962, CROWTHER und MELNICK, 1961).

Im Gegensatz dazu konnten WALLIS und MELNICK (1963 b) zeigen, daß auch reife Polioviruspartikel durch einfaches Mischen mit heterozyklischen Farbstoffen photosensitiviert werden konnten. Die Partikel mußten jedoch hoch gereinigt und in 0,1 m Phosphatpuffer (pH 8,0) vorliegen.

OPTON und GREEN (1960) konnten einen Unterschied in der Photosensibilität zwischen virulenten und einem aviru-

lenten (LSc) Poliovirus Typ-1 Stamm feststellen, wobei letzterer in Gegenwart einer hohen Konzentration von Neutralrot eine erhöhte Infektiosität zeigte.

2.4.4.2 Resistenz gegenüber photoinaktivierenden Farbstoffen

DINTER und DIDERHOLM (1972) konnten durch Dauerpassagen in Kälberhodenzellkulturen mit 0,5 µg/ml Acriflavin im Virusmedium einen gegen diese Verbindung resistenten BVD-Virusstamm züchten. Der resistente Stamm behielt diese Eigenschaft auch nach 11maliger Zellkulturpassage in Abwesenheit von Acriflavin bei. Dieser Stamm war zuvor in zahlreichen, nicht genau gezählten Passagen attenuiert worden. Alle Experimente wurden bei Rotlicht durchgeführt, um eine Photoinaktivierung durch Sonnenlicht zu vermeiden. Sie entwickelten eine Testmethode, in der die Differenz zwischen Plaquezahl in Gegenwart von 0,5 µg/ml Acriflavin und in Abwesenheit dieses Farbstoffes als Inhibitions-Index ausgedrückt wurde. Acriflavin-empfindliches Virus erhielt auf diese Weise hohe Indexwerte, der Acriflavin-resistente Stamm (BVD-ACR) dagegen niedrige. Diesen BVD-ACR Stamm benutzten ROCKBORN et al. (1974) als Impfstamm. Das von 5 geimpften Kälbern reisolierte Virus behielt diesen Acriflavin-Marker bei.

2.4.5 Inaktivierung durch Dithiothreitol (DTT)

KLINGEBORN und DINTER (1972) beschrieben diesen Marker bei Inaktivierungsversuchen mit equinem Rhinopneumonitis-Virus. Dithiothreitol (DTT) ist ein langsam reagierendes Agens, welches die Disulfidbrücken der Proteinstruktur reduziert bzw. löst. Einige Viren werden von DTT inakti-

viert, z.B. Vaccinia-Virus, ND-Virus und Polyoma-Virus, während andere resistent zu sein scheinen (einige Picorna-Viren). Der hoch attenuierte Impfstamm RAC-H 419 wurde durch DTT nur geringfügig (d.h. $\log. 10^{0,75} \text{ KID}_{50}$) inaktiviert, zwei andere Stämme mäßig ($\log. 10^{1,25} \text{ KD}_{50}$), während 11 Isolate von abortierten Feten nach Behandlung mit 0,002 M DTT-haltigem Erhaltungsmedium 2,25 bis 3,5 log-Einheiten ihrer Infektiosität verloren.

Daneben waren der hoch attenuierte und der wenig attenuierte RAC-H Stamm nicht fähig, in L-B Zellen Plaques zu bilden, während alle Feldisolate diese Fähigkeit besaßen. KLINGEBORN prüfte anschließend diesen DTT-Marker, indem er 12 trächtige Stuten mit der RAC-H Vaccine impfte, wobei alle Stuten zum Zeitpunkt der Impfung Antikörper gegen Rhinopneumonitis besaßen. Es gelang in 10 Fällen das Virus zu reisolieren. Die dabei zurückgewonnenen Impfstammreisolate hatten ihre Resistenz gegenüber DTT behalten.

2.4.6 Inaktivierung durch Guanidinhydrochlorid

DAVID-WEST (1973) fand einen einfach durchzuführenden Test, um Rekombinanten verschiedener Elternvirusstämme bei Influenzaviren zu unterscheiden.

Guanidinhydrochlorid wurde in Endkonzentrationen von 0,5, 1,0 und 1,5 M zur Virussuspension hinzugefügt. Nach Inkubation über 30 Minuten bei 37° C wurde die Restinfektiosität von Hämagglutinin im HA-Mikrotest und von Neuramidase mittels des Sialinsäurenachweises bestimmt. Die Inaktivierungskinetik der beiden Hüllantigene wies bei den Rekombinanten jeweils eine deutliche Ähnlichkeit mit derjenigen der Elternvirusstämme auf. Dieses spezifische "Profil" soll durch das Virusgenom determiniert sein. Der Test stellte eine Ergänzung zu den gebräuchlichen serologischen Methoden bei der Hybridisierung von Influenzaviren dar.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Virusmaterial

BACHMANN et al. (1972) isolierten aus Darm und Lymphknoten eines klinisch manifest erkrankten Ferkels einen TGE Virusstamm. Von diesem, im folgenden als Bl-Stamm bezeichnet, wurde niedrig passiertes Material (4 Passagen in Schweineschilddrüsen) und hoch passiertes Material (120 Passagen in Schweineschilddrüsen) untersucht. Als Vergleichsstämme dienten der in Japan isolierte SH-Stamm (114 Passagen in Schweinenieren, 6 Passagen in Schilddrüsen, SHEFFY, 1965) und der Purdue-Stamm (31 Passagen in fetalen Schweinenieren), der freundlicherweise von Dr. K.H. WITTE zur Verfügung gestellt wurde. Die Vermehrung aller Stämme erfolgte in sekundären Schweineschilddrüsen (ST)-Zellkulturen. Nach Gefriertauen und Zentrifugation wurden die Überstände jeweils in 2 ml-Mengen bei -70° C aufbewahrt. Sie dienten als Virusausgangsmaterial für alle Untersuchungen.

3.1.2 Zellkulturen

3.1.2.1 Herstellung von Schweineschilddrüsen- zellkulturen

Die Schilddrüsen kamen aus dem normalen Schlachtbetrieb des Schlachthofs München sowie in geringer Zahl von institutseigenen Ferkeln und Läuferschweinen. Der Transport erfolgte in PBS (Phosphate Buffered Saline), dem 200 mg/l Nebacetin und 4 mg/l Amphotericin zugefügt war.

Die Schilddrüsen wurden nach Entfernung der Kapsel zur Oberflächensterilisation je 2mal in 95%igen Alkohol getaucht und abgeflammt. Dann wurden die Organe in kleine Stückchen von 1-2 mm Kantenlänge zerschnitten und 3mal in PBS gewaschen. Die größte Zellausbeute ergaben hellrote, weiche Organe, die sich leicht zerschneiden ließen (LIEBERMANN und VETTERLEIN, 1970).

Den so gewonnenen Gewebestückchen wurde eine 0,37%ige Trypsin-PBS-Lösung (ohne Ca^{++} und Mg^{++}) zugesetzt, anschließend folgte fraktionierte Trypsinierung bei 37°C auf einem Magnetrührer. Nach Verwerfen des ersten Trypsinates (nach 1 Stunde Trypsinierungszeit) erfolgte die Abnahme der folgenden 3-4 Trypsinate jeweils nach 1 1/2 Stunden, Filtration der Zell-Trypsin-Suspension durch einen 4-6fachen Mullfilter und Lagerung der Fraktionen bei 4°C . Die Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von Serum gehemmt. Nach Abschluß des Gewebeaufschlusses erfolgte Zentrifugation der gesamten Zell-Trypsin-Suspension über 10 Minuten bei 500 g. Nach Verwerfen der Überstände wurde das Sediment in PBS suspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in 10 ml Medium aufgenommen und die gewonnenen Zellen mit 1%iger Trypanblaulösung in einer Zählkammer ausgezählt. Zur Anzucht betrug die Konzentration 500.000 Zellen/ml Medium. Um das Festsetzen der Zellen auf der Glasunterlage nicht zu stören, wurden die Kulturen in den ersten beiden Tagen nicht bewegt. Mediumwechsel erfolgte nach 2-3 Tagen, war jedoch häufig nicht notwendig. In der Regel waren die primären ST-Kulturen nach 4-6 Tagen mit epitheloider Morphologie dichtgewachsen. War dies nicht der Fall, wurden die Kulturen verworfen. In diesen Kulturen traten regelmäßig wabenartig vakuolisierte Zellbezirke auf. LIEBERMANN und VETTERLEIN (1970) vermuteten die Ursache in der inkretorischen Funktion der Epithelzellen.

Die Ablösung der zur Subkultivierung bestimmten Zellkulturen erfolgte mit einer Saline-Trypsin-Versen Lösung von der Glasunterlage:

100 ml Saline 10-fach (ohne Ca^{++} und Mg^{++})

50 ml Trypsinlösung (1,25%ig)

25 ml Versen (EDTA) - Lösung (1%ig)

10 ml NaHCO_3 (8,8%ig)

ad 1000 ml aqua dest.

Der Zellrasen wurde nach 1maligem Waschen mit dieser Lösung überschichtet. Nach 15 Minuten ließen sich die Zellen gewöhnlich leicht abschütten. Nach Zentrifugation (500 g, 3 Min.) wurden sie in einer Teilungsrate von 1:2 in die entsprechenden Anzuchtgefäße eingesät. Zur Einsaat in Plaquetest-Petrischalen betrug die Teilungsrate 1:1.

3.1.2.2 Zell-Linien

Die Vermehrungsfähigkeit der 4 TGE-Stämme wurde in der SK- (KASZA et al., 1972) und PK-15 Zell-Linie (American Type Culture Collection, CCL 33) untersucht. Die Beimpfung von jeweils 4 dichtgewachsenen Zellkulturröhrchen erfolgte mit 0,5 ml Virussuspension der einzelnen Stämme ($10^{4,5}$ - 10^5 KID₅₀/0,2 ml). Mit jedem Stamm wurden 5 Passagen in beiden Zelllinien durchgeführt, die anschließend sofort ausitiert wurden.

3.1.3 Medien

Zur Züchtung der ST-Zellkulturen sowie der PK-15 Zell-Linie diente Earle's Salzlösung (EARLE, 1934), während für die SK-Zell-Linie Hanks' Salzlösung benutzt wurde (HANKS, 1948). Beiden Salzlösungen wurde jeweils 10 ml/l Medium der 100fach konzentrierten Lösungen 1, 2, 3 und 4 des "Minimal Essential Medium" (MEM) nach Eagle zugefügt (MAYR et al., 1974).

Anreicherung der Medien erfolgte mit:

Kälberserum:

In Anzuchtmedien wurde Kälberserum 10%ig, in Erhaltungsmedien 5%ig benutzt. Dem Agar- sowie dem Tylose-Overlay wurden 5% fetales Kälberserum zugesetzt.

Laktalbuminhydrolysat (LA):

50ml/l einer 5%igen Stammlösung diente allen Medien als Zusatz.

Antibiotika:

Da der normale Schlachtbetrieb ein steriles Entnehmen der Organe nicht ermöglichte, erfolgte die Zugabe folgender Konzentrationen ins Medium (in I.E./ml bzw. µg/ml):

	Penicillin	Streptom.	Nebacetin	Amphotericin
ST-Anzuchtmed.	200	200	200	4
ST-Erhaltungsmed.	100	100	50	2,5
Med.f.Zell-Linien	100	100	-	2,5

3.1.4 Virustitrierung

Alle Proben wurden in sekundären ST-Zellkulturröhrchen titriert. Dazu erfolgte die Verdünnung des Materials in 10er Potenzen (0,3 ml Virusmaterial, 2,7 ml Earle-MEM), die auf 4 Zellkulturröhrchen pro Verdünnungsstufe (0,2 ml Virusverdünnung, 1,3 ml Erhaltungsmedium) verimpft wurden. Die Endablesung erfolgte am 3. Tag p.inf. auf Grund des CPE. Zur Berechnung der Infektiositätstiter diente die Methode von KÄRBER (1931).

3.1.5 Vermehrungsfähigkeit bei verschiedenen Temperaturen

Die Vermehrung der 4 Stämme wurde bei 40°, 37°, 33°, 28° und 22° C geprüft. Dazu erfolgte die Verimpfung von 0,2 ml

Virussuspension (Ausgangstitier $10^{4,5}$ bzw. $10^{5,0}$ KID₅₀/0,2 ml) auf jeweils 4 Zellkulturröhrchen. Nach 40 Stunden wurden sämtliche Röhrchen bei -70° C eingefroren, wieder aufgetaut und Zelltrümmer abzentrifugiert. Die Titration der Überstände und Verimpfung von 0,2 ml des Überstands auf neue Zellkulturröhrchen erfolgte anschließend. Auf diese Weise wurden von jedem Stamm bei den angegebenen Temperaturen 6 Passagen durchgeführt.

3.1.6 Vermehrungskurve bei 37° C

Dichtgewachsene ST-Röhrchen wurden nach 2maligem Waschen mit PBS mit 0,5 ml Virussuspension (je $10^{4,5}$ KID₅₀/0,2 ml Bl-120 und SH; je $10^{4,0}$ KID₅₀/0,2 ml Bl-4 und Purdue) beimpft.

Nach einer Adsorptionszeit von einer Stunde bei 37° C wurde das Animpfmateriäl abgesaugt, die Kultur 2mal mit PBS gewaschen, anschließend mit 1,5 ml Erhaltungsmedium überschichtet und bei 37° C inkubiert.

Nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 38 und 48 Stunden wurden pro Virusstamm jeweils 3 Röhrchen entnommen und bei -70° C eingefroren. Die Bestimmung der Infektiositätstiter der Gesamtkultur (Zellphase und Mediumphase) erfolgte durch Titration.

3.1.7 Plaquebildung

3.1.7.1 Plaquebildung unter Agaroverlay

Die sekundären ST-Zellen waren nach 3-4 Tagen in Plastikpetrischalen (60 x 15 mm, Fa. Falcon Plastics) im CO₂-Inkubator dichtgewachsen. Die Kulturen wurden 2mal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte Zugabe von 0,5 ml der Virusverdünnung auf die Zellen. Nach einer Adsorptionszeit von

2 Stunden bei 37° C wurde die Virussuspension abgesaugt, die Kulturen 2mal mit Earle's MEM gewaschen und mit 0,5 ml Agaroverlay überschichtet.

Die Herstellung des Agaroverlay erfolgte folgendermaßen: 20 g Agar (hochrein, Fa. Merck) wurden in 1000 ml kochendem aqua dest. gelöst, 15 Minuten bei 121° C autoklaviert und in 100 ml Mengen abgefüllt und bei 4° C gelagert.

Bei Bedarf wurde der feste Agar durch Kochen verflüssigt und dann im Wasserbad auf 43° C abgekühlt. Doppelt konzentriertes Erhaltungsmedium (im Wasserbad auf 43° C erwärmt) zu gleichen Teilen mit dem 2%igen, flüssigen Agar gemischt, ergab das fertige Overlay. Die überschichteten Monolayer wurden im CO₂-Brutschrank (5% CO₂-Gehalt) 3 Tage bebrütet. Danach erfolgte Fixierung und Färbung der Zellen mit einer Formalin-Kristallviolett-Lösung folgender Zusammensetzung:

25% Formalin (36%ig)

25% Kristallviolett (5%ig)

50% aqua dest.

(WITTE, 1971)

Nach einigen Stunden konnte der Agar mit der Pinzette von der Unterlage gelöst werden. Die auf der Unterlage haftenden, gefärbten Zellen waren monatelang haltbar.

3.1.7.2 Plaquebildung unter Tyloseoverlay

Für den Dithiothreitol-Test wurde Methylzellulose (Tylose) als halbfestes Overlay verwandt: 3,75 g Methylzellulose (4000 Centipoise) wurden mit 500 ml Erhaltungsmedium gemischt, nachdem die Tylose zuvor 2mal 30 Minuten trocken sterilisiert worden war. Durch mindestens 5maliges Gefriertauen (-20° C) erfolgte die Lösung der Tylose im Erhaltungsmedium (MAYR et al., 1974). Fixierung und Färbung der Zellen erfolgte wie unter Agaroverlay angegeben.

3.1.8 Immunserumherstellung

Anti-TGE-Hyperimmunserum wurde in einem 8 Wochen alten SPF-Läuferschwein gegen den niedrig passierten (4. ST.) Bl-Stamm hergestellt. Dazu bekam das Schwein im Abstand von jeweils 14 Tagen 3 x 3ml Antigen oral verabreicht. Das Immunserum wurde 3 Wochen nach dem letzten Booster durch Ausbluten des Tieres gewonnen.

Die Bestimmung des Immunserumtiters erfolgte im Mikro-Neutralisationstest nach der Serumverdünnungsmethode und betrug 1:128.

3.1.9 Plaque-Neutralisationskinetik

In wiederholten Vorversuchen war diejenige Serumverdünnung des TGE-Immunserums ermittelt worden, die 90% der homologen Virusmenge (5×10^5 PFU/ml Bl. 4. ST) neutralisiert hatte. Diese Verdünnungsstufe diente als Serumgebrauchsdosis für den Haupttest, bei dem die Neutralisation mit vorgewärmten Lösungen im 37° C-Wasserbad erfolgte. 0,1 ml der Serumgebrauchsdosis und 0,1 ml der Virusgebrauchsdosis (5×10^5 PFU/ml für alle 4 Stämme) wurden mit 0,8 ml Erhaltungsmedium gemischt. Von der Virus-Serummischung wurden bei Inkubationsbeginn (t_0) sowie nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten jeweils 0,1 ml entnommen, 1:100 in vorgekühltem Erhaltungsmedium verdünnt und bis zur Titrierung der verbliebenen Infektiosität im Eisbad aufbewahrt. Dazu wurden 0,5 ml der in 10er Potenzen titrierten Verdünnungen in der oben angegebenen Technik auf je 3 Plaqueschalen sekundärer ST-Zellen pro Verdünnungsstufe gegeben. Nach Fixierung, Färbung und Abnehmen des Agars erfolgte durch Auszählen der Plaques die Bestimmung der Restinfektiosität zu den verschiedenen Zeiten. Die Restinfektiosität wurde halblogarithmisch gegen die Zeit eingetragen und die

Neutralisationskonstante nach der von MC BRIDE (1959) angegebenen Formel errechnet:

$$K = (D/t) 2,3 \log (V_o/V_t)$$

D = reziproke Serumverdünnung

t = Reaktionszeit in Minuten

V_o = Infektiosität bei t_o

V_t = Infektiosität bei Ende der Reaktionszeit.

Der NK-Wert stellte die auf Prozentwerte umgerechnete Neutralisationskonstante dar, wobei der homologe Stamm den NK-Wert 100 erhielt.

3.1.10 Inaktivierung durch Dithiothreitol

DTT wurde in 0,01 M tris-Aminomethan-HCl-Puffer (pH 8,1) am Tag des Experiments gelöst und bei 37° C zur Virus-suspension zugegeben (Endkonzentration des DTT betrug 0,002 Mol). Nach 60 und 120 Minuten wurden Proben von dieser Mischung genommen und im Eisbad bis zur Titrierung aufbewahrt.

Bei Reaktionsende wurde die Restinfektiosität der Proben im Plaquetest unter Tyloseoverlay bestimmt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Vermehrungsfähigkeit bei verschiedenen Temperaturen

Bei 37° C und 40° C vermehrten sich alle 4 untersuchten Stämme. Bei 33° C vermehrten sich nur noch der Bl 120, SH- und der Purdue Stamm, während der Bl 4-Stamm nach der 2. Zellkulturpassage nicht mehr nachweisbar war.

Bei 28° C war bei allen 4 Stämmen nach der 2. Passage keine Infektiosität mehr vorhanden.

Bei 40° C erreichten die beiden hochpassierten Stämme Bl 120 und SH Infektiositätstiter von $10^{5,75}$ bzw. $10^{5,5}$ KID₅₀/0,2 ml (Tab. 5), während der Purdue- und der Bl 4-Stamm Höchstititer von $10^{4,5}$ bzw. $10^{4,0}$ erzielten.

Bei 37° C lagen die von Bl 120 und SH erzielten Höchstititer bei $10^{6,25}$ bzw. $10^{6,0}$, diejenigen der niedrigpassierten Stämme bei $10^{4,5}$ KID₅₀/0,2 ml (Tab. 5).

Bei 33° C erreichten Bl 120 und SH ihre höchsten Titer nach der 6. Passage mit $10^{4,25}$ bzw. $10^{4,5}$, während der niedrigpassierte Purdue Stamm einen höchsten Infektiositätstiter von $10^{2,75}$ hatte. Der Bl 4-Stamm dagegen vermehrte sich bei dieser Temperatur nicht mehr, sondern es verblieben in den ersten beiden Passagen Resttiter von $10^{1,0}$ KID₅₀/0,2 ml (Tab. 5).

Bei 28° C lagen die Infektiositätstiter aller 4 Stämme nach der ersten Passage bei $10^{1,5}$ bzw. $10^{2,0}$ und sanken dann ab (Tab. 5).

Aus Tab. 5 erkennt man, daß bei 37° C sowohl die beiden hochpassierten als auch die niedrigpassierten Stämme nahe beieinanderliegende Werte und vergleichbare Infektiositätstiter in den 6 Passagen aufwiesen. Bei 40° C ergab sich ein ähnliches Bild.

Tab. 5: Infektiositätstiter von 4 TGE-Virusstämmen nach 6maliger Passagierung bei Inkubationstemperaturen von 28° C, 33° C, 37° C und 40° C (log 10 KID₅₀/0,2 ml).
Die Ernte erfolgte nach jeweils 40 Std. p.inf.

Temp.	Stämme	Passagenzahl					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.
37° C	Bl 4	3,75	4,0	4,5	4,5	4,25	4,5
	Purdue	4,0	4,25	4,25	4,5	4,5	4,5
	Bl 120	4,5	5,5	6,0	6,25	6,0	6,0
	SH	4,75	5,5	5,5	6,0	5,5	5,75
40° C	Bl 4	3,0	4,0	3,75	4,0	3,75	4,0
	Purdue	3,0	4,0	4,0	4,5	4,0	4,0
	Bl 120	3,75	4,25	5,25	5,75	5,5	5,5
	SH	3,5	4,25	4,75	5,5	5,25	5,5
33° C	Bl 4	1,0	1,0	0	0	0	0
	Purdue	2,0	2,75	2,0	1,75	2,25	2,5
	Bl 120	4,0	4,0	3,5	4,0	3,75	4,25
	SH	4,0	4,0	3,25	3,75	4,0	4,5
28° C	Bl 4	1,75	0,75	0	0	0	0
	Purdue	1,5	0	0	0	0	0
	Bl 120	2,0	1,25	0	0	0	0
	SH	1,75	1,0	0	0	0	0

Mittlere Infektiositätstiter wurden von den niedrigpassierten Stämmen nach der 2. Passage erreicht, während die hochpassierten Stämme diese Titer erst nach der 4. Passage aufwiesen. Sie benötigten eine etwas längere Adaptierungszeit als die niedrigpassierten Stämme.

Bei 33° C zeigten der Bl 120- und der SH-Stamm eine fast gleichlaufende Kurve ihrer Vermehrungsfähigkeit. Die In-

Infektiositätstiter des Purdue-Stammes lagen um durchschnittlich 10^2 KID₅₀ unter dieser Kurve. Eine Adaptierung an die veränderte Temperatur schien bei den 3 Stämmen nach der 5. Passage erreicht zu sein. Diese Adaptierung gelang bei dem Bl 4-Stamm nicht. Nach 2 Zellkulturopassagen war bei diesem Stamm kein infektiöses Virus mehr nachweisbar.

Bei 28° C verlief die Abnahme der Infektiositätstiter für Bl 4, Bl 120 und SH einheitlich. Lediglich der Purdue Stamm war schon nach der 1. Passage nicht mehr nachweisbar, während die übrigen Stämme ihre Infektiosität nach der 2. Passage verloren hatten.

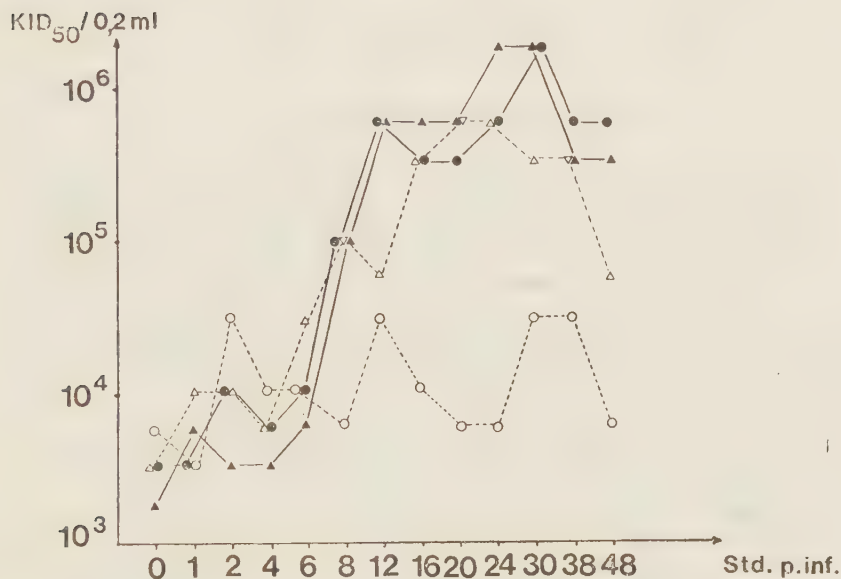
3.2.2 Vermehrungskurve bei 37° C

Abb. 1 zeigt die Vermehrungskurven der Gesamtkultur (Mediumpphase und zellgebundene Phase) der 4 untersuchten Stämme. Eine Einschnitt-Vermehrungskurve konnte nicht durchgeführt werden, da der Infektiositätstiter des Bl-4-Stammes nicht hoch genug war, um wenigstens 1 KID₅₀ pro Zelle zu erhalten. Bei der Vermehrungskurve lagen die Infektiositätstiter der beiden hochpassierten Stämme Bl 120 und SH bis zur 6. Stunde p.inf. zwischen $10^{3,25}$ und $10^{4,0}$. Nach 12 Stunden erreichten sie einen ersten Höhepunkt von $10^{5,75}$ KID₅₀/0,2 ml. Höchstititer wurden von beiden Stämmen 24 bzw. 30 Stunden p.inf. mit $10^{6,25}$ erreicht.

Nach der 30. Stunde fielen beide Titer um 0,5 log ab. Der niedrigpassierte Purdue-Stamm verhielt sich ähnlich. Einen ersten Höchstititer erreichte er nach 8 Stunden mit $10^{5,0}$ KID₅₀, wogegen seine Maximaltiter zwischen der 20. und 24. Stunde p.inf. bei $10^{5,75}$ lagen. Nach der 24. Stunde wurde auch bei diesem Stamm ein Titerabfall registriert.

Abb. 1: Vermehrungskurven von 4 TGE-Virusstämmen in sek. ST-Zellkulturen

Δ-----Δ Purdue-Stamm ▲-----▲ SH-Stamm
 O-----O Bl 4-Stamm ●-----● Bl 120-Stamm



Der Bl 4-Stamm dagegen verhielt sich anders als die übrigen Stämme. Seine Infektiositätswerte schwankten über den gesamten Vermehrungszeitraum von 48 Stunden zwischen $10^{3,5}$ und $10^{4,5}$ KID₅₀/0,2 ml.

Lediglich zwischen der 30. und 38. Stunde war der Höchstititer konstant. Dieses Verhalten des Bl 4-Stammes läßt auf eine ungenügende Zellkulturadaptierung schließen. Eine Hemmung der Virusvermehrung durch Interferenz mit nicht-infektiösen Viruspartikeln bzw. Interferonbildung ist jedoch nicht ausgeschlossen.

3.2.3 Vermehrung in Schweinezell-Linien

Sowohl in der SK- als auch in der PK-15 Zell-Linie war schon nach der 1. Passage bei allen 4 Stämmen kein infektiöses Virus mehr nachweisbar. Die folgenden 4 Passagen bestätigten dieses negative Ergebnis.

3.2.4 Plaquebildung unter Agaroverlay

Unter festem Overlay bildeten alle Stämme auf sekundären ST-Zellen nach 2 Tagen Inkubationszeit deutliche Plaques unterschiedlicher Größe. Die Plaques waren gekennzeichnet durch ihre runde Gestalt, den scharfen Rand und ein klares, durchsichtiges Aussehen. In der Plaquegröße jedoch unterschieden sich alle Stämme voneinander, die Werte für die einzelnen Stämme sind in Tab. 6 angeführt.

Zur Signifikanzberechnung der unterschiedlichen Plaquegrößen der 4 Stämme diente folgende Formel (CAVALLISFORZA, 1969):

$$d = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{p_x (1-p_x) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

$n_{1,2,3,4}$ = Gesamtzahl der
ausgezählten
Plaques

$a_{1,2,3,4}$ = Zahl der gezählten
Plaques $> 2,9$ mm

$$p_1 = \frac{a_1}{n_1}$$

$$p_2 = \frac{a_2}{n_2}, \quad \text{usw.}$$

$$p_x = \frac{a_1 + a_2}{n_1 + n_2}$$

Tab. 6: Plaquegröße von 4 TGE-Stämmen auf sekundären ST-Zellkulturen

Stamm	Plaquezahl	Plaquegröße	arithm. Mittelwert
Bl 4	17	< 2,3 mm	
	47	2,3 - 2,9 "	
	68	2,9 - 3,5 "	2,9 mm
	<u>8</u>	> 3,5 "	
	140		
Bl 120	14	< 2,9 mm	
	31	2,9 - 3,5 "	
	40	3,5 - 4,1 "	4,4 mm
	68	4,1 - 4,7 "	
	<u>17</u>	> 4,7 "	
	170		
SH	9	2,9 mm	
	21	2,9 - 3,5 "	
	50	3,5 - 4,7 "	4,7 mm
	63	4,7 - 5,3 "	
	<u>15</u>	> 5,3 "	
	158		
Purdue	21	< 2,3 mm	
	39	2,3 - 2,9 "	
	37	2,9 - 3,5 "	3,1 mm
	<u>44</u>	> 3,5 "	
	141		



B1.4.ST



B1.120.ST



Pu.31.FSN



SH 114.SN

Abb. 2: Plaquebildung von 4 TGE-Stämmen (B1 4, B1 120, Purdue, SH) auf sekundären ST-Zellkulturen nach 2tägiger Inkubationszeit bei 37° C (Agaroverlay, Kristallviolett-Formalin-Färbung). 1,5fache Vergrößerung

Bezogen auf die Signifikanzberechnung der Plaquegrößen von Bl 4 und Bl 120 ergibt sich:

$$d = \frac{0,543 - 0,918}{\sqrt{0,749 (0,251) \left(\frac{1}{140} + \frac{1}{170}\right)}} = \frac{0,375}{\sqrt{0,00245}} = 7,58$$

$$\text{also } 0,0001 > p > 0,00001$$

Bezogen auf Bl 4 und Purdue gilt entsprechend:

$$d = \frac{0,543 - 0,575}{\sqrt{0,56 (0,44) \left(\frac{1}{140} + \frac{1}{141}\right)}} = \frac{0,032}{\sqrt{0,003508}} = 0,54$$

d liegt damit über der Signifikanzgrenze von $p = 0,05$ (= 95%ige Sicherheit).

Zwischen Bl 120 und SH gilt:

$$d = \frac{0,918 - 0,944}{\sqrt{0,95 (0,05) \left(\frac{1}{170} + \frac{1}{158}\right)}} = \frac{0,026}{\sqrt{0,00058}} = 1,08$$

Auch hier liegt d über der Signifikanzgrenze von $p = 0,05$. Signifikante Unterschiede bestehen also zwischen den hochpassierten und den niedrigpassierten Stämmen, jedoch nicht zwischen beiden niedrigpassierten oder beiden hochpassierten Stämmen.

3.2.5 Neutralisationskinetik

Die in Vorversuchen bestimmte Serumgebrauchsdosis war eine 1:16 Verdünnung des gegen den Bl 4-Stamm erzeugten spezifischen Immunsarums ($D = 16$).

Die Ergebnisse sind aus Abb. 3 ersichtlich. Die Restinfektiositätswerte zu den verschiedenen Zeiten bei den einzelnen Stämmen sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7: Streuung der Prozentwerte der Restinfektiosität von 4 TGE-Virusstämmen nach Neutralisation mit Anti-Bl 4-Serum vom Schwein

TGE Stamm	Restinfektiosität in % nach Minuten				
	5	15	30	60	120
Bl 4	70 - 84	26 - 31	7,6 - 8,7	0,4 - 0,7	0,016-0,03
Bl 120	60 - 63	24 - 31	6,9 - 8,7	0,37- 1,1	0,05 -0,11
Purdue	85 - 75	42 - 45	7,3 - 8,05	1,6 - 1,96	0,33 - 0,45
SH	68 - 83	18 - 35	6,8 - 11,8	2,06- 4,02	0,41 - 0,75

Der isologe Bl 4-Stamm wurde am vollkommensten neutralisiert. Der Bl 120-Stamm unterschied sich erst nach 120 Minuten Neutralisation schwach von Bl 4, während Purdue und SH sowohl nach 60 als auch nach 120 Minuten deutlich höhere Restinfektiositätswerte behielten als die beiden Bl Stämme. Setzt man die Restinfektiositätswerte in die Formel nach MC BRIDE zur Errechnung der Neutralisationskonstanten ein, so erhält man für die verschiedenen Stämme nach 60 Minuten Neutralisation folgende Werte:

Abb. 3: Neutralisationskinetik von 4 TGE-Virusstämmen mit Anti-B1 4-Serum vom Schwein ($D = 16$)

$\triangle$ — $\triangle$ Purdue-Stamm $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ SH-Stamm
 $\circ$ — $\circ$ B1 4-Stamm $\bullet$ — $\bullet$ B1 120-Stamm



$$\text{für Bl 4:} \quad K = \frac{16}{60} 2,3 \log \frac{287}{2} = 1,32$$

$$\text{für Bl 120:} \quad K = \frac{16}{60} 2,3 \log \frac{90}{1} = 1,2$$

$$\text{für SH:} \quad K = \frac{16}{60} 2,3 \log \frac{42,3}{1,7} = 0,86$$

$$\text{für Purdue:} \quad K = \frac{16}{60} 2,3 \log \frac{87}{1,7} = 1,05$$

Daraus errechnen sich die NK-Werte als prozentuales Verhältnis zum isologen Neutralisationswert ($1,32 = 100$).

Tab. 8: Vergleichende K- und NK-Werte nach Neutralisation mit Anti-Bl 4-Serum ($D = 16$)

Virusstamm	Anti Bl 4-Serum			
	nach 60 Min. K-Wert	NK-Wert	nach 120 Min. K-Wert	NK-Wert
Bl 4	1,32	100	1,07	100
Bl 120	1,2	91	1,01	94
SH 114	1,05	79	0,89	83
Purdue 31	0,86	65	0,77	72

Der Purdue- ($K = 0,86$) und der SH-Stamm ($K = 1,05$) erbrachten die am stärksten von den beiden Bl-Stämmen ($K = 1,32$ bzw. $1,2$) abweichenden Werte, während die beiden Bl-Stämme untereinander nur schwach differierende K- und NK-Werte aufwiesen.

Ob hier eine Signifikanz der intratypischen Unterschiede besteht, vermögen nur weitere vergleichende Stammesuntersuchungen zu zeigen.

3.2.6 Inaktivierung durch Dithiothreitol

Dithiothreitol (DTT) hatte in Konzentrationen von 0,002 M auf die hochpassierten Stämme eine nur wenig stärker inaktivierende Wirkung als auf die niedrigpassierten Stämme. Während die beiden niedrigpassierten Stämme nach 120 Minuten Inaktivierungszeit noch eine Restinfektiosität von 6,2% (Bl 4) bzw. 7,6% (Purdue) der Ausgangsinfektiosität aufwiesen, besaßen die hochpassierten Stämme nur noch Restinfektiositätswerte von 5,7% (Bl 120) bzw. 4% (SH).

Die erhaltenen Restinfektiositätswerte sind in Tab. 9 aufgeführt.

Tab. 9: Restinfektiosität von 4 TGE-Virusstämmen nach Inaktivierung durch 0,002 M Dithiothreitol nach 60 und 120 Minuten (in PFU/0,5 ml)

TGE Stamm	Ausgangstitel	Restinfektiosität nach	
		60 Min.	120 Min.
Bl 4	8×10^4	$3,6 \times 10^4$	5×10^3
Bl 120	8×10^6	8×10^5	4×10^5
Purdue	6×10^5	$1,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$
SH	5×10^6	7×10^5	2×10^5

3.3 Besprechung der Ergebnisse

Obwohl seit langem bekannt ist, daß bei der TGE zwischen Virusstämmen, die längere Zeit in Zellkulturen passiert wurden, und Virusstämmen, die direkt von TGE-Seuchenzügen isoliert wurden, biologische Unterschiede in-vivo bestehen (BOHL, 1967; WITTE und EASTERDAY, 1967; BOHL et al., 1972), sind nur wenige Untersuchungen über Eigenschaften dieser Virusstämmen in-vitro bekannt (RISTIC und ABOU-YOUSSEF, 1972; PENSAERT et al., 1970).

Unterschiede zwischen Feldvirusisolaten und an Zellkulturen adaptierte TGE-Virusstämmen in-vitro schienen bisher lediglich in der Vermehrungskinetik und in der Empfänglichkeit für bestimmte Zellkulturen zu bestehen (WITTE und EASTERDAY, 1967; BOHL und KUMAGAI, 1965). Dabei wurde festgestellt, daß sich Feldstämmen nur schwierig auf Schweinenierenzellkulturen (ENS) adaptieren lassen und eine Reihe von Stämmen sich in ENS-Kulturen nicht vermehrt (WITTE und EASTERDAY, 1967).

Bestätigt werden konnte die Beobachtung, daß die Vermehrung von TGE-Feldvirusstämmen in Zellkulturen generell zu niedrigeren Infektiositätstitern führt, als nach Adaptierung der Stämme. Dies trifft sowohl für ENS-Kulturen als auch für die wesentlich empfindlicheren Schilddrüsenkulturen vom Schwein zu. Die Infektiositätstiter von Virusstämmen in der 4. (Bl 4) und 31. (Purdue) Zellkulturpassage waren um mindestens $1,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/0,2 \text{ ml}$ niedriger als bei den Stämmen der 120. Passage (Bl 120, SH).

Dieser unterschiedlichen Vermehrungskinetik ist es vermutlich auch zuzuschreiben, daß Unterschiede in der Plaquegröße zwischen nur wenig adaptierten und gut adaptierten Virusstämmen auftraten. Der Bl-Feldvirusstamm und der nur über wenige Zellkulturpassagen geführte Purdue-Stamm pro-

duzierten auf Zellkulturen von Schweineschilddrüsen (ST) Plaquegrößen, die mit 2,9 bzw. 3,1 mm ähnlich waren und innerhalb der Signifikanzgrenze lagen. Diese Plaquegrößen unterschieden sich jedoch signifikant $0,0001 > p > 0,00001$ von den in über 100 Passagen geführten SH- bzw. Bl-Stämmen.

Im Gegensatz dazu konnten BOHL und KUMAGAI (1965) keine Unterschiede in Bezug auf die Plaquegröße bei 6 Feldisolaten und 3 in Schweinenierenzellkulturpassagen adaptierten Stämmen feststellen. Dieser Widerspruch kann in der unterschiedlichen Empfänglichkeit und damit Vermehrungsfähigkeit von TGE-Stämmen in Schweinenierenzellkulturen im Vergleich zu Schweineschilddrüsenzellkulturen liegen. WITTE und EASTERDAY (1967) fanden, daß TGE-Stämme sich in Schweinenieren- weniger gut als in Schweineschilddrüsenzellkulturen vermehrten, so daß möglicherweise Unterschiede in der Plaquebildung in Schweinenierenzellkulturen wegen der langen Bebrütungszeit nicht festgestellt werden konnten.

Einen weiteren Hinweis dafür, daß TGE-Virus sich nur in bestimmten Zellkulturen vermehrt, stellten die negativen Ergebnisse in den Versuchen, Schweinenierenzelllinien für die Vermehrung heranzuziehen, dar.

Den deutlichsten Unterschied zwischen Feldvirus und den an Zellkulturen adaptierten Stämmen ergab die Vermehrung bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen. Bei 37° C und 40° C wiesen die hochpassierten Stämme in etwa gleiche Infektiositätstiter auf, während Purdue und Bl-4 um ca. 1,5 log₁₀ reduzierte Titer zeigten. Dagegen vermehrte sich das Feldisolat bei 33° C nicht mehr. Purdue, SH und Bl-120 vermehrten sich bei dieser Temperatur mit deutlich niedrigeren, jedoch gleichbleibenden Infektiositätstitern.

Ob die Eigenschaft des Feldvirus, sich bei 33° C nicht zu vermehren, als Marker für die Differenzierung zwischen Feldvirus- und attenuierten Impfvirusstämmen benutzt werden kann, müssen Untersuchungen mit weiteren Virusisolaten zeigen.

Bisher ist TGE-Virus serologisch als einheitlich beschrieben worden (BOHL, 1967; WITTE und EASTERDAY, 1967), obwohl Unterschiede in der Immunantwort zwischen an Zellkulturen adaptierten Stämmen und Wildstämmen beobachtet wurden. Ähnliche Verhältnisse sind auch für Poliovirus (WECKER; KOPROWSKI et al.; MC BRIDE) sowie VD-Virusstämme (HAFEZ und LIESS, 1972) bekannt. Mit Hilfe der von WECKER (1960) bzw. MC BRIDE (1959) erarbeiteten hochempfindlichen Differenzierungsmethoden konnten dabei intratypische antigenetische Unterschiede zwischen einzelnen Poliovirusstämmen festgestellt werden.

Die hier durchgeführten Versuche mit 4 TGE-Virusstämmen und einem gegen die Bl-Stämme entwickelten Immunserum ergaben nur schwache Hinweise dafür, daß ähnliche Verhältnisse auch bei TGE-Virus vorliegen können. In der Neutralisationskinetik unterschieden sich der Purdue und der SH-Stamm nach 60 bzw. 120 Minuten deutlich von den beiden Bl-Stämmen.

Ob aus diesen Ergebnissen eine Signifikanz oder eine intratypische Heterogenität geschlossen werden kann, bleibt fraglich, da zum einen weitere Stämme in die Untersuchung einbezogen werden müssen, zum anderen aber auch spezifische gegen die heterologen Stämme gerichtete Immunseren mit den Bl-Immunseren verglichen werden müssen. Festzustellen ist jedoch aus diesen Versuchen, daß sich die 120. Zellkulturpassage des Bl-Stammes in seiner Antigenität von dem Feldvirusisolat nicht unterschied. Vermutlich lassen sich mit diesem Test nur Unterschiede zwischen verschiedenen einzelnen Stämmen ermitteln. Zur Darstellung

immunogener Unterschiede zwischen homologen Feld- und zellkulturadaptierten TGE-Stämmen scheint er nicht geeignet zu sein.

Die beschriebenen Untersuchungen stellen einen ersten Schritt zur in-vitro Differenzierung von verschiedenen TGE-Virusstämmen dar.

3.4 Zusammenfassung

Einige in-vitro Eigenschaften von 4 TGE (Übertragbare Gastroenteritis) Virusstämmen wurden verglichen. Dabei unterschieden sich das Feldisolat des Bl-Stammes und ein nur über wenige Zellkulturpassagen geführter Purdue-Stamm in der Vermehrungskinetik sowie in der Plaquebildung deutlich von dem Bl-Stamm der 120. Zellkulturpassage und dem hochpassierten SH-Stamm.

Die Infektiositätstiter der beiden hochpassierten Stämme lagen in der Regel um mindestens $10^{1,5} \text{KID}_{50}$ über denen der niedrigpassierten Stämme.

Bei den hochpassierten Stämmen waren die Plaquedurchmesser nach 2 Tagen Inkubationszeit fast doppelt so groß wie bei den niedrigpassierten Stämmen.

Der Purdue Stamm (31. Passage) sowie Bl 120 und SH (120. Passage) vermehrten sich bei Inkubationstemperaturen von 33°C , 37°C und 40°C . Das Feldisolat (Bl 4) vermehrte sich ebenfalls bei 37°C und 40°C , nicht jedoch bei 33°C über 6 Zellkulturpassagen.

Diese Temperaturempfindlichkeit als Marker für zukünftige Differenzierungsmöglichkeiten zu nutzen wurde diskutiert.

Die Ergebnisse der Neutralisationskinetik mit einem gegen Bl 4 gerichteten Immuns serum ergaben Hinweise für eine mögliche intratypische serologische Heterogenität einzelner TGE-Virusstämme. Die statistische Absicherung dieser Ergebnisse (K- und NK-Werte nach 60 Min. bzw. 120 Min.) war jedoch schwierig.

Summary

In vitro properties of four transmissible gastroenteritis virus strains were investigated. Differences were revealed between a field isolate (Bl) and a low cell culture passaged Purdue strain in growth kinetics and plaque formation when compared with high passages of the cell culture adapted Bl-strain and SH-strain.

Infectivity titers of high passage strains regularly were at least $10^{1,5} \text{TCID}_{50}$ higher than titers of low passage strains. In addition plaques sizes were nearly twice as large in high passage strains than in low passage strains after two days of incubation.

The Purdue strain (31st passage) as well as strain Bl-120 and SH-114 replicated at incubation temperatures of 33°C , 37°C , and 40°C , whereas the field isolate failed to grow at 33°C . The possibilities to use this temperature dependence of replication of the field isolate as marker is discussed.

Results of neutralization kinetics using an immune serum against the Bl-4 strain revealed a possible intratypic serologic heterogenicity of the different TGE virus strains.

It was difficult, however, to obtain a statistical significance of these results (K- and NK-values after 60 and 120 minutes).

4. LITERATURVERZEICHNIS

- AGCI, v.l., and M.Y. CHUMAKOVA, 1962: An agar polysaccharide and d marker of poliovirus.
virology 17, 221.
- ALBRECHT, P., and H.P. SCHUMACHER, 1971: Markers for measles virus. I. Physical properties.
Arch. ges. virusforsch. 36, 23.
- BACHMANN, P.A., T. HÄNICHEN, K. DANNER, und B. BIBRACK, 1972: Zur Epidemiologie der Übertragbaren Gastroenteritis (TGE) beim Schwein.
Zbl. Vet. Med. B. 19, 166.
- BALAYAN, M.S., M.K. VOROSKILLOVA, L.L. SINYAK, and A.B. CHUMAKOVA, 1969: The mechanism of plaque formation by poliovirus strains of different virulence.
mater. XVI. scient. Conf. Inst. Poliom. Vir. Enceev. 1, 134.
- BANERJEE, K., and K.R.P. SINGH, 1969: Loss of mouse virulence in Chikungunya virus from the carrier culture of Aedes albopictus cell line.
Indian J. med. Res. 57, 1003.
- BENGTTSSON, S., 1968: Attempts to map the poliovirus genome by analysis of selected recombinants.
Acta path. microbiol. scand. 73, 1.
- BENGTTSSON, S., Z. DINTER, and L. PHILIPSON, 1963: Genetic markers associated with virulence of foot-and-mouth disease virus.
Proc. Soc. exp Biol. Med. 113, 1019.

- BENGTSSON, S., and L. PHILIPSON, 1963: Countercurrent distribution of poliovirus type 1. virology 20, 176.
- BENGTSSON, S., L. PHILIPSON, H. PERSSON, and T.C. LAURENT, 1964: The basis for the interaction between attenuated poliovirus and polyanions. virology 24, 617.
- BENYESH-MELNICK, M., and J.L. MELNICK, 1960:
Correlations of in vitro markers of poliovirus strains and monkey neurovirulence.
I. Comparison of vaccine and field strains.
II. Intramuscular inoculation of vaccine progeny strains, and serial spinal cord passage of t-strains.
Fed. Proc. 19, 407.
- BLASKOVIC, P., A.J. RHODES, and N.A. LABZOFFSKY, 1972: Infection of chick embryo tracheal organ cultures with influenza A-2 virus. Arch. ges. virusforsch, 37, 104.
- BOHL, E.H., 1967: Immunologic studies on transmissible gastroenteritis of swine. Proc. World Vet. Cong. 18, 577.
- BOHL, E.H., 1970: Transmissible Gastroenteritis. in: Diseases of Swine. 3rd Ed. by H.W. Dunne Iowa State university Press, Ames, S. 158 - 176.
- BOHL, E.H., K.P. GUPTA, L.W. MC CLOSKEY, and L.J. SAIF, 1972: Immunology of TGE. J. Am. vet. med. Ass. 160, 543.

- BOHL, E.H., K.P. GUPTA, F. OLQUIN, and L.J. SAIF, 1972: Antibody responses in serum, colostrum and milk of swine after infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. Inf. Imm. 6, 289.
- BOHL, E.H., and T. KUMAGAI, 1965: The use of cell cultures for the study of TGE virus of swine. Proc. U. S. Livestock Sanit. Ass. 69, 343.
- BORGEN, H.C., 1970: Differentiation of equine herpesvirus type 1 strains by a plaque marker. Arch. ges. Virusforsch. 32, 283.
- BROWN, F., and D.I. STEWARD, 1960: The influence of proflavin on the synthesis of foot-and-mouth disease virus. J. gen. Microbiol. 23, 369.
- VON BÜLOW, V., 1966: Infektiöse Bronchitis der Hühner. II. Änderung der Virusvirulenz nach Serienpassagen in Zellkulturen. Zbl. Vet. med. B. 13, 671.
- BUYNAK, E.B., and M.R. HILLEMANN, 1966: Live attenuated mumps virus vaccine: vaccine development. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 768.
- CAMPBELL, C.H., 1969: Virulence, adsorbability, and antigenicity of foot-and-mouth disease virus selected by adsorption with homogenized mouse kidney. Arch. ges. virusforsch. 26, 238.

CAMPBELL, J.B., and J.S. COLTER, 1965: Studies of three variants of mengo-encephalomyelitis virus :.
III. Effect of overlay and polyanions on plaque size.
virology 25, 608.

CARP, R.J., and H. KOPROWSKI, 1962: A new test of the RCT marker of poliovirus: the limited thermal exposure test. (LTE).
virology 16, 71.

CARP, R.J., and H. KOPROWSKI, 1962 b : investigations of the reproductive capacity temperature marker of poliovirus.
Virology 16, 371.

CAVALLI-SFORZA, L., 1969: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
G. Fischer Verl. Stuttgart 2. Auflage

CHOPPIN, P.W., and H.J. EGGERS, 1962: Heterogenicity of Coxsackie B 4 virus: two kinds of particles which differ in antibody sensitivity, growth rate, and plaque size.
virology 18, 470.

CHOPPIN, P.W., and J. TAMM, 1960: Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A 2 virus strains. 1. Characterization of stable homogeneous substrains in reactions with specific antibody, mucoprotein inhibitors, and erythrocytes.
J. exp. Med. 112, 895.

CLIFTON, C.E., 1931: Photodynamic action of certain dyes on the inactivation of staphylococcus bacteriophage.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 28, 745.

- CROWTHER, D., and J.L. MELNICK, 1961: The incorporation of neutral red and acridine orange into developing poliovirus particles making them photosensitive. virology 14, 11.
- DANIEL, M.D., and L.V. MELENDEZ, 1968: Herpes T virus variants.
Arch. ges. Virusforsch. 25, 18.
- DAVID-WEST, T.S., 1973: A new genetic marker for influenza virus subunits.
Arch. ges. Virusforsch. 41, 143.
- DE MAYER, E., and J.F. ENDERS, 1964/65: Growth characteristics, interferon production and plaque-formation with different lines of Edmonston measles virus.
Arch. ges. Virusforsch. 16, 151.
- DINTER, Z., and H. DIDERHOLM, 1971: Bovine virus diarrhea virus : inhibition of growth by proflavin sulphate.
Arch. ges. Virusforsch. 34, 388.
- DINTER, Z., and H. DIDERHOLM, 1972: Bovine virus diarrhea virus: acquired resistance to acriflavine.
Arch. ges. Virusforsch. 38, 2/4.
- DOUGLAS, R.G. jr., R.B. COUCH, B.D. BAXTER, and M. GOUGH, 1974: Attenuation of rhinovirus type 15 : relation of illness to plaque size.
Inf. Imm. 9, 519.
- DULBECCO, R., and M. VOGT, 1958: Studies on the induction of mutations in poliovirus by proflavin.
Virology 5, 236.

DUNAYEVICH, M., H.N. JOHNSON, W. BURLESON, 1961:

Selection of a clone of the Western Equine Virus which is not pathogenic for young adult mice.
Virology 12, 295.

DZHIIVANYAN, T.I., and V.A. LASHKEVICH, 1970: The effect of sulfolipopolysaccharides on plaque formation by viruses of the tick-borne encephalitis complex with different neurovirulence.
Vop. Virus 4, 395.

DZHIIVANYAN, T.I., G.G. BANNOVA, E.S. SARMANOVA, M.V. CHUPRINSKAYA, J. VESENJAK-HIRJAN, V. VINCE, 1974: On the possible association of the DS marker of tick-borne encephalitis virus strains with species of tick vectors.
Arch. ges. Virusforsch. 45, 209.

EAGLE, H., 1959: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.
Science 130, 432.

EARLE, W.R., 1934: A technique for adjustment of oxygen and carbon dioxide tensions and hydrogen ion concentration in tissue cultures planted in Carrel flasks.
Arch. exp. Zellforsch. 16, 116.

EGGERS, H.J., and A.B. SABIN, 1959: Factors determining pathogenicity of variants of ECHO-9 virus for newborn mice.
J. exp. Med. 110, 951.

FENNER, F., and D.O. WHITE, 1970: Medical virology.
Academic Press, Inc., New York.

- FERRIS, D.H., 1972: Epizootiologic features of transmissible swine gastroenteritis.
J. Am. vet. Med. Ass. 159, 184.
- FIGUEROA, M.E., and W.E. RAWLS, 1969: Biological markers for differentiation of herpesvirus strains of oral and genital origin.
J. gen. virol. 4, 259.
- FISZMAN, M., D. BUCCHINI, and M. GIRARD, 1971: Purification of the Sabin strain of poliovirus type 1.
J. virol. 7, 687.
- GARD, S., 1960: Immunological strain specificity within type 1 poliovirus.
Bull. Wld. Hlth. Org. 22, 235.
- GHENDON, Y.Z., and B.S. SITNIKOV, 1970: Resistance of the region on DNA coding ts₄₀ marker of vaccinia virus to certain inactivating factors.
Arch. ges. virusforsch. 29, 101.
- GILL, S.G., and J. FURESZ, 1973: Genetic stability in humans of the rabbit immunogenic marker of Cendehill rubella vaccine virus.
Arch. ges. virusforsch. 43, 135.
- GORDIENKO, N.M., G.S. YAKOVLEVA, and O.G. ANDZHAPARIDZE, 1973: Changes in some genetic markers of measles virus strain L-16 in the course of passaging in various cell cultures.
Acta virol. 17, 366.

- GRAUMANN, H., E. UECKER, und L. GRAFE, 1969: Zum atypischen Verlauf der Transmissiblen Gastroenteritis (TGE) der Schweine.
Mh. Vet. Med. 24, 139.
- HAFAZ, S.M., and B. LIESS, 1972: Studies on the bovine viral diarrhea-mucosal disease virus.
i. Cultural behaviour and antigenic relationship of some strains.
Acta virol. 16, 388.
- HAFAZ, S.M., and B. LIESS, 1972 b: Studies on the bovine viral diarrhea-mucosal disease virus.
ii. Stability and some physico-chemical properties.
Acta virol. 16, 399.
- HAMILTON, R., L. BARBOSA, and M. DUBOIS, 1973: Subacute sclerosing panencephalitis measles virus : study of biological markers.
J. virol. 12, 632.
- HANKS, J.H., 1948: The longevity of chick tissue cultures without removal of medium.
J. cell. comp. physiol. 31, 235.
- HANSON, R.P., 1956: An intracerebral inoculation test for determining the safety of Newcastle disease vaccines.
Am. J. Vet. Res. 17, 16.
- HENLE, W., 1963: Interference and interferon in persistent viral infections of cell cultures.
J. Immunol. 91, 145.
- HODES, H.L., H.D. ZEPP, and E. AINBERGER, 1960:
A physical property as a virus marker. Differences in avidity of cellulose resin for virulent (Mahoney) and attenuated (LSc, 2ab) strain of type 1 poliovirus.
Virology 11, 306.

- HOOPER, B.E., 1972: Comments on the pathogenesis of transmissible gastroenteritis of swine. J. Am. vet. med. Ass. 160, 540.
- HUYGELEN, C., and J. PEETERMANS, 1967: Attenuation of rubella virus by serial passage in primary rabbit kidney cell cultures. II. Experiments in animals. Arch. ges. virusforsch. 21, 357.
- KÄRBER, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn - Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacologie 162, 480.
- KANDA, Y., and J.L. MELNICK, 1959: in vitro differentiation of virulent and attenuated poliovirus by their growth characteristics on mS cells. J. exp. med. 109, 9.
- KARZON, D.T., A.L. BARRON, 1961: Variation in ECHO viruses. Am. J. Dis. Child. 102, 5C3.
- KASZA, L., J.A. SHADDUCK, and G.J. CHRISTOFINIS, 1972: Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6. Res. vet. Sci. 13, 46.
- KILBOURNE, E.D., F.S. LIEFF, J.L. SCHULMAN, R.I. JAHIEL, and W.G. LAVER, 1967: Antigenic hybrids of influenza viruses and their implications. in : Perspectives in virology vol. V 87-106.
- KLINGEBORN, B., and Z. DINTER, 1972: Equine abortion (herpes) virus : strain differences in susceptibility to inactivation by dithiothreitol. Appl. Microbiol. 23, 1121.

- KLINGEBORN, B., 1973: Equine abortion (herpes) virus :
evaluation of markers in a field vaccination trial.
Appl. Microbiol. 26, 566.
- KOPROWSKI, n., T.W. NORTON, E. WECKER, and S. GARD, 1960:
Genetic markers and serologic identification of
wild and attenuated strains of type 1 poliovirus,
with special emphasis on strains isolated from
patients during an epidemic in the Belgian Congo.
Bull. Wld. Hlth. Org. 22, 243.
- KUNIN, C.M., 1962: Virus tissue union and the pathogenesis
of enterovirus infections.
J. Immunol. 88, 556.
- LEINIKKI, P., 1973: Typing of the herpesvirus hominis strains
by indirect immunofluorescence and biological markers.
Acta. path. microbiol. scand. 81, 65.
- LIEBERMANN, n., und W. VETTERLEIN, 1970: Beobachtungen bei
virologischen Arbeiten mit Schweineschildr senzell-
kulturen.
Arch. exp. Vet. Med. 24, 559.
- LIEBHABER, H., and K.K. TAKEMOTO, 1963: The basis for the
size differences in plaques produced by variants of
encephalomyocarditis (EMC) virus.
virology 20, 559.
- LINDEMANN, JR., C.C., L. HUTCHINSON, T.C. ROTTE, M.E. HEGG,
and G.M. SCHIFF, 1974: Stability of the rabbit
immunogenic marker of RA 27/3 rubella vaccine virus
after human passage.
Inf. Imm. 9, 547.

- LOKTEVA, V.F., M.P. CHUMAKOV, V.I. ZHEVANDROVA, and L.A. SHEKOYAN, 1972: Differential sensitivity of virulent and attenuated strains of type 1 polio-virus to polyethylene glycol as a possible new genetic marker.
Arch. ges. Virusforsch. 41, 156.
- LOMNICZI, B., 1973: Studies on the interferon production and interferon sensitivity of different strains of Newcastle disease virus.
J. gen. virol. 21, 305.
- LOMNICZI, B., 1974: Biological properties of Aujeszky's disease virus strains with special regard to interferon production and interferon sensitivity.
Arch. ges. Virusforsch. 44, 205.
- LOMNICZI, B., and D.C. BURKE, 1970: Interferon production by temperature sensitive mutants of Semliki forest virus.
J. gen. Virol. 8, 55.
- LONDON, W.T., D.A. FUCILLO, A. LEY, and J.L. SEVER, 1971: Antibody response of various strains of rubella virus when inoculated into rabbits.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 925.
- LWOFF, A., and M. LWOFF, 1958: L' inhibition du development du virus poliomyélitique à 39° et le problème du role de l'hyperthermie dans l'evolution des infections virales.
C. R. Acad. Sci. 246, 190.

- LOWRY, S.P., J.L. MELNICK, and W.E. RAWLS, 1971:
investigation of plaque formation in chick embryo
cells as a biological marker for distinguishing
herpesvirus type 1.
J. gen. virol. 10, 1.
- MAASAB, H.F., 1970: Development of variants of influenza
virus.
in : Biology of large RNA viruses (ed. by R.D. Barry
and B.W.J. Mahy), S. 542-566.
- MACKENZIE, J.S., 1970: Studies with temperature sensitive
mutants of influenza virus.
in : Biology of large RNA viruses (ed. by R.D. Barry
and B.W.J. Mahy), S. 507-534.
- MAYR, A., F.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN, 1974:
Virologische Arbeitsmethoden Bd. I.
G. Fischer verlag Stgt.
- MAYR, A., K. STROHMAIER und R. LORENZ, 1961: Veränderungen
chemisch-physikalischer Eigenschaften des Virus der
ansteckenden Schweinelähmung (Teschener Krankheit)
während des Modifizierungsprozesses durch Dauer-
passagen in Schweinenierenkulturen.
Arch. ges. Virusforsch. 11, 183.
- MAYR, A., und G. WITTMANN, 1960: Virusdauerpassagen in
Zellkulturen als modifizierender Faktor für die
Entwicklung einer Lebendvaccine gegen Maul- und
Klauenseuche.
Zbl. vet. Med. 7, 829.
- MC BRIDE, W.D., 1959: Antigenic analysis of poliovirus by
kinetic studies of serum neutralization.
Virology 7, 45.

- MENGELING, W.L., 1973: Porcine coronaviruses : co-infection of cell cultures with transmissible gastroenteritis virus and hemagglutinating encephalomyelitis virus. Am. J. Vet. Res. 34, 779.
- MORILLA, A., and M. RISTIC, 1973: Immunologic discrepancy between intestinal and cell culture viruses of transmissible gastroenteritis virus of swine. Am. J. Vet. Res. 34, 1533.
- NIETZSCHKE, E., und E. SCHMITTDIEL, 1960: Über die Unterscheidung und Charakterisierung von Virusstämmen der Newcastle Krankheit. Berl. Münchn. tierärztl. Wschr. 73, 148
- NORMAN, J.O., G. LAMBERT, and H.W. MOON, 1973: Age dependent resistance to transmissible gastroenteritis. Canad. J. comp. med. 37, 157.
- OKINAWA, A., and M. MAEDA, 1965: Histopathology of transmissible gastroenteritis in experimentally infected newborn piglets. I. Lesions in the digestive tract. Nat. Inst. Animal Health Quart. 5, 190.
- OPTON, E.M., and R.H. GREEN, 1960: Effects of neutral red and light on polioviruses. Fed. Proc. 19, 408.
- OSTER, G., J. BELLIN, R.W. KINBALL, and M.E. SCHRADER, 1959: Dye sensitized photooxidation. J. Am. Chem. Soc. 81, 5095.

- OXFORD, J.S., and C.W. POTTER, 1970: An immunologic marker technique for the Cendehill vaccine strain of rubella virus.
J. Immunol. 105, 818.
- UZAKI, Y., A.R. DIWAN, W.D. MC BRIDE, and J. MELNICK, 1962: Antigenic characterisation of oral poliovaccine progeny neutralization kinetics.
J. Immunol. 90, 288.
- Parker, J.R., A.G. WOUTERS, and M.S. SMITH, 1969: Physical changes of Wesselbron virus occurring during attenuation in foetal lamb kidney cells.
Arch. ges. Virusforsch. 26, 305.
- PATTYN, S.R., and U. VLEESSCHAUWER, 1968: The multiplication of Middleburg S- and L-plaque viruses in Aedes aegypti mosquitos.
Acta virol. 12, 347.
- PENSAERT, M., T. BURNSTEIN, and E.O. HAEELTERMAN, 1970 a : Cell-culture-adapted Sh strain of transmissible gastroenteritis of pigs : in vivo and in vitro studies.
Am. J. vet. Res. 31, 771.
- PENSAERT, M., E.O. HAEELTERMAN, and T. BURNSTEIN, 1970 b : Transmissible gastroenteritis of swine : virus-intestinal cell interactions.
Arch. ges. Virusforsch. 31, 321.
- PERVIKOV, Y.V., L.A. GRACHEVA, M.K. VOROSHILOVA, and M.P. CHUMAKOV, 1973: Specificity of rabbit Ig M Ig G antibody in intratypic differentiation of poliovirus type 1 strains.
Arch. ges. Virusforsch. 43, 7-

- PLOTKIN, S.A., B.J. COHEN, and H. KOPROWSKI, 1961:
Intratypic serodifferentiation of poliovirus.
Virology 15, 473.
- ROCKBORN, G., H. DIDERHOLM, and Z. DINTER, 1974:
Bovine viral diarrhea virus : acquired resistance
to acriflavine as marker of an attenuated strain.
Arch. ges. virusforsch. 45, 128.
- RISTIC, M., and M.H. ABOU-YOUSSEF, 1972: Comments on the
immunology of transmissible gastroenteritis.
J. Am. vet. Med. Ass. 160, 549.
- SCHAEFFER, F.L., 1962: Binding of proflavin by and photoin-
activation of poliovirus propagated in the presence
of the dye.
Virology 18, 412.
- SCHIFF, L.J., 1974: Studies on the mechanism of influenza
virus infection in hamster trachea organ culture.
Arch. ges. Virusforsch. 44, 135.
- SCHIFF, L.J., J. STORZ, and J.R. COLLIER, 1973: Kinetics
of viral adsorption in singly and multiply infected
bovine cells.
Am. J. vet. Res. 34, 1453.
- SCHUMACHER, H.P., P. ALBRECHT, N.M. TAURASO, 1972: Markers
for measles virus. II. Tissue culture properties.
Arch. ges. Virusforsch. 36, 296.
- SELLERS, R.F., 1963: Virulence and interferon production of
strains of foot-and-mouth disease virus.
J. Immunol. 93, 6.

- SHEFFY, B.E., 1965: Characterization of transmissible gastro-enteritis virus.
Proc. U. S. Livestock San. Ass. 69, 351.
- STONE, S.S., S.L. STARK, and M. PHILIPS, 1974: TGE-virus in neonatal pigs: intestinal transfer of colostral immunoglobulin containing specific antibodies.
Am. J. vet. Res. 35, 339.
- STRENGE, A., 1972: Vergleichende Untersuchung über biologische, chemische und physikalische Unterschiede bei verschiedenen Rhinopneumonitisstämmen.
Med. Vet. Diss. München 1972.
- TAKEMOTO, K.K., and H. LIEBHABER, 1961: Virus-polysaccharid interactions. I. An agar polysaccharid determining plaque morphology of EMC virus.
Virology 14, 456.
- TAKEMOTO, K.K., and H. LIEBHABER, 1962: Virus-polysaccharid interactions. II. Enhancement of plaque formation and the detection of variants of poliovirus with dextran sulfate.
Virology 17, 499.
- TAMOGILIA, T.M., 1972: Present status of products available for use against TGE.
J. Am. vet. med. Ass. 160, 554.
- TAJIMA, M., 1970: Morphology of TGE.
Arch. ges. virusforsch. 99, 105.
- THEILER, M., and H.H. SMITH, 1937: The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus.
J. exp. Med. 65, 767.

- THORSEN, J., and S. DJURICKOVIC, 1970 : Experimental immunization of sows with cell-cultured TGE virus. Canad. J. comp. Med. 34, 177.
- THORSEN, J., and S. DJURICKOVIC, 1972: Experimental immunization of sows with inactivated transmissible gastroenteritis (TGE) virus. Canad. J. comp. Med. 35, 99.
- TRIBE, G.W., D.C. WOLFF, and M.A. GREENAWAY, 1973: Methods of differentiation between virulent and attenuated strains of infectious canine hepatitis. Vet. Rec. 99, 442.
- VOGT, M., R. DULBECCO, and H.A. WENNER, 1957: Mutants of poliomyelitis virus with reduced efficiency of plating in acid medium and reduced neuropathogenicity. Virology 4, 141.
- WALLIS, C., and J.C. MELNICK, 1962: Magnesium chloride enhancement of cell susceptibility of poliovirus. virology 16, 122.
- WALLIS, C., and J.L. MELNICK, 1963 a : Selection of attenuated poliovirus from virulent suspensions by heating in aluminium chloride. virology 18, 483.
- WALLIS, C., and J.L. MELNICK, 1963: Photodynamic inactivation of poliovirus. virology 21, 332.
- WALLIS, C., F. MORALES, J. POWELL, and J.L. MELNICK, 1966: Plaque enhancement of enterovirus by magnesium chloride, cysteine, and pancreatin. J. Bacteriol. 91, 1932.

- WECKER, E., 1960: A simple test for serodifferentiation of poliovirus strains within the same type.
virology 10, 376.
- WENNER, H.A., P. KAMITSUKA, M. LENAHAH, and J.L. MELNICK, 1956: A comparative study of type 2 poliomyelitis viruses.
II. Antigenic differences relating to 18 type 2 strains.
J. immunol. 77, 220.
- WIKTOR, T.O., and H. CLARK, 1973: Comparison of rabies virus strains by means of the plaque reduction test.
Ann. Inst. Pasteur 124, 283.
- WITTE, K.H., und G. AMTSBERG, 1969: Feststellung der TGE der Schweine in Deutschland. II. Virologische Untersuchungen.
Dt. tierärztl. Wschr. 20, 537.
- WITTE, K.H., and B.C. EASTERDAY, 1967: Isolation and propagation of the virus of transmissible gastroenteritis of pigs in various pig cell cultures.
Arch. ges. virusforsch. 20, 327.
- WITTE, K.H., 1971: Micro-color test for assay of transmissible gastroenteritis virus-neutralizing antibodies.
Arch. ges. Virusforsch. 33, 171.
- WOODE, G.N., 1969: Transmissible gastroenteritis of swine.
vet. Bull. 39, 239.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr möchte ich an dieser Stelle für die Bereitstellung des vorzüglichen Arbeitsplatzes danken.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn P.D. Dr. P. A. Bachmann für seinen jederzeit gewährten Rat und die bereitwillige Unterstützung der Arbeit. Das dabei entstandene gute Arbeitsklima trug wesentlich zur Vollendung der Arbeit bei.

L e b e n s l a u f

Am 20.7.1945 wurde ich als Sohn des Buchhalters Herbert Heß und seiner Ehefrau Margarete, geb. Krumm in Wahlbach, Kreis Siegen geboren.

Das Abitur legte ich am 9.2.1965 am Neusprachlichen Gymnasium in Dillenburg ab.

Nach 2-jähriger Dienstzeit bei der Bundeswehr studierte ich in Gießen und München Veterinärmedizin.

Im Frühjahr 1973 beendete ich das Studium mit dem Staatsexamen.

